

212

# ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG  
DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

BEGRÜNDET VON

J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

A. RIPPEL-BALDES UND R. HARDER

GÖTTINGEN

15. BAND



BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG  
SPRINGER-VERLAG

1950/51

# ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERGEBNISSE  
DER BEAKTUELLEN MIKROBIOLOGISCHEN

HERAUSGEGEBEN VON  
FRIEDRICH O. SCHWENKE  
A. RIBBEL SAUER & J. HARDER

12. BAND



Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

Druck der Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

Printed in Germany.



## Inhaltsverzeichnis.

v. 15

Seite

## Heft 1

KÜSTER, EBERHARD, Untersuchungen über die Bildung und Zersetzung von Humusstoffen durch Mikroorganismen. Mit 1 Textabbildung. . . . .	1
JOHANNES, HEINRICH, Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien. Mit 6 Textabbildungen . . . . .	13
WINTER, A. GERHARD, Untersuchungen über die Ökologie und den Massenwechsel bodenbewohnender mikroskopischer Pilze. Mit 12 Textabbildungen . . . . .	42
WINTER, A. GERHARD, und ROSMARIE VON RÜMCKER, Die Mikroflora der Rhizosphäre als resistenzbestimmender Faktor. Mit 5 Textabbildungen. . . . .	72
BRINGMANN, GOTTFRIED, Methoden der Selektion zur Steigerung der antibiotischen Wirksamkeit bei <i>Penicillium notatum</i> . Mit 5 Textabbildungen . . . . .	85
JANKE, ALEXANDER, <i>Acetobacter Lafarianum</i> nov. nom. . . . .	116
HEINZEL, EDITH, Experimentelle Untersuchungen zur Ausbildung von Faden- und Kettenformen bei <i>Bacterium prodigiosum</i> . Mit 5 Textabbildungen. . . . .	119
MÜLLER, HANNELORE, Oxalsäure als Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen. Mit 3 Textabbildungen. . . . .	137
STILLE, BERND, Eine mikrobiologische Methode zum Nachweis von Samen- und Wurzelabscheidungen. Mit 1 Textabbildung . . . . .	149
KAPLAN, REINHARD W., Mutationsauslösung bei <i>Bacterium prodigiosum</i> durch sichtbares Licht nach Vitalfärbung mit Erythrosin. Mit 5 Textabbildungen . . . . .	152
CZAJA, ALFONS THEODOR, Stalaktiten-Fruchtkörper von <i>Merulius lacrymans</i> var. <i>domesticus</i> . Mit 1 Textabbildung . . . . .	176

## Heft 2

DIETZEL, E., H. BEHRENBRUCH und M. EUCKEN, Stoffwechselversuche an <i>Actinomyceten</i> . Mit 3 Textabbildungen . . . . .	179
AM ENDE, INGEBOG, Zur Ernährungsphysiologie des Pilzes der <i>Xanthoria parietina</i> . Mit 6 Textabbildungen . . . . .	185
BURCIK, ERWIN, Über die Beziehungen zwischen Hydratur und Wachstum bei Bakterien und Hefen. Mit 18 Textabbildungen . . . . .	203
GROSSER, ANNEMARIE, HANNE KUNDTNER-SCHWARZKOPF und KONRAD BERNHAUER, Über den Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Farbstoffbildung durch <i>Penicillium</i> -Arten . . . . .	236
GROSSER, ANNEMARIE, HANNE KUNDTNER-SCHWARZKOPF und KONRAD BERNHAUER, Einige Beobachtungen über die <i>Conidien</i> -bildung in der Submerskultur verschiedener <i>Penicillium</i> -Arten . . . . .	247

	Seite
BEATUS, RICHARD, Entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen an <i>Ascomyceten</i> . Mit 10 Textabbildungen . . . . .	253
REINHARDT, KARL, Der Stoffwechsel heterotropher Flagellaten III—VIII. III. Mitteilung . . . . .	270
BAUMANN, A., und V. DENK, Zur Physiologie der Sulfatreduktion . . . . .	283
DENK, VIKTOR, Zur Frage der Ammonentstehung im Stoffkreislauf der Natur. (Vorläufige Mitteilung) . . . . .	308
SCHULZE, KARL LUDWIG, Beiträge zur Physiologie und Technologie der Fettbildung bei Mikroorganismen. Mit 14 Textabbildungen . . . . .	315
FÜCHTBAUER, HERTA, Vorkommen von <i>Azotobacter agilis Beijerinck</i> in Deutschland . . . . .	352
FINCK, GERTRUD, Biologische und stoffwechselphysiologische Studien an <i>Myxococcaceen</i> . Mit 27 Textabbildungen . . . . .	358

## Heft 3

KREHL-NIEFFER, ROSE, M., Verbreitung und Physiologie mikroskopischer Bodenpilze . . . . .	389
WILHARM, G., und G. HOLZ, Beitrag zur Kenntnis des Acroleins in Obstbränden, Maischen und Mosten. II. Mitteilung . . . . .	403
BÖMEKE, H., Nitrosomonas oligocarbogenes, ein obligat autotrophes Nitritbakterium. Mit 7 Tabellen und 2 Textabbildungen . . . . .	414
ZIEGLER, HUBERT, Über eine neue Beeinflussung der Sporangienentwicklung von <i>Phycomyces</i> durch Paraffinöl. Mit 1 Textabbildung . . . . .	428
KANDLER, OTTO, Über den Einfluß von Bodenbakterien und deren Filtraten auf das Wachstum in vitro kultivierter Wurzeln . . . . .	430
GESSNER, FRITZ, und AMELY DIEHL, Die Wirkung natürlicher Ultraviolettstrahlung auf die Chlorophyllzerstörung von Planktonalgen. Mit 10 Textabbildungen . . . . .	439
MÜLLER-STOLL, WOLFGANG R., Untersuchungen über das Verhalten von <i>Botrytis cinerea</i> gegenüber Seifen und Seifenersatzstoffen . . . . .	454
JANKE, ALEXANDER, Der mikrobielle Abbau der Aminosäuren. Sammelbericht . . . . .	472



(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

## Untersuchungen über die Bildung und Zersetzung von Humusstoffen durch Mikroorganismen\*.

Von

EBERHARD KÜSTER.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 30. März 1949.)

Das zahlreiche Vorkommen von Mikroorganismen aller Art im Boden ließ schon seit langem vermuten, daß diese an der Bildung von Humusstoffen beteiligt seien. Schon mehrfach war die Bildung dunkler Stoffe durch verschiedene Organismen beobachtet worden, die den natürlichen Humusstoffen ähnlich waren. Bekannt sind die Untersuchungen von VAN ITERSON an einem Cellulose zersetzenden Schimmelpilz, *Pyrenochaeta humicola*, von RIPPEL/WALTER über das Aspergillin, den schwarzen Sporenfarbstoff von *Aspergillus niger*, von BORTELS und BEHR an *Aspergillus niger* und in neuester Zeit von LAATSCH (1948) an *Aktinomyceten*. Da sich in den Versuchen von BEHR *Aspergillus niger* als ein geeignetes Versuchsobjekt erwies, wurde es von mir zu weiteren Untersuchungen herangezogen, um die Beziehungen seiner dunklen Stoffwechselprodukte zu den natürlichen Humusstoffen aufzuklären und weiterhin auch zu prüfen, welche Mikroorganismen für den Abbau dieser Stoffe im Boden in Frage kommen.

### Methodik.

Eine physiologisch alkalische Nährlösung wird durch *Asp. niger* im Verlauf des Wachstums und der danach einsetzenden Autolyse rot, rotbraun und schließlich dunkelbraun-schwarz gefärbt. Die Ausgangslösung war folgendermaßen zusammengesetzt: 6% Rohrzucker, 0,48%  $\text{NaNO}_3$ , 0,25%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,125%  $\text{MgSO}_4$ , 0,005%  $\text{ZnSO}_4$ . Die Lösung war so ausbalanciert, daß der gesamte gebotene Stickstoff durch den Pilz voll verbraucht wurde. Das C/N-Verhältnis der Ausgangslösung war hierfür ausschlaggebend, es betrug 30:1. Da bei den Stickstoffbestimmungen des Autolysates ein Rest von unverbrauchtem Nitratstickstoff störte, wurde stets die obige verhältnismäßig wenig Nitrat enthaltende Nährlösung verwandt. Es wurde mit 50 bzw. 100 cm<sup>3</sup> Lösung in 200- und 300 cm<sup>3</sup>-ERLENMEYER-Kolben gearbeitet, die vor dem Beimpfen im Autoklaven bei 1,5 Atm. sterilisiert worden waren.

Als Versuchsobjekt diente *Asp. niger* Stamm *Edendorf*, der vor einigen Jahren aus der Lüneburger Heide isoliert worden war und sich durch eine besonders schwarze Sporenfärbung und eine früh und intensiv einsetzende Autolyse mit

\* Auszug aus der Dissertation „E. KÜSTER: Untersuchungen an humus-ähnlichen Stoffen in den Autolyse-Produkten von *Aspergillus niger*“. Göttingen, Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, 1949.

Dunkelfärbung auszeichnete. Nach durchschnittlich 30tägiger Kulturdauer war die Autolyse soweit fortgeschritten, daß die Lösung fast schwarz erschien, und auch das Mycel war tief dunkelbraun gefärbt und schmierig-weich geworden. Der Verlauf der  $p_H$ -Werte während der Kultur zeigte infolge der starken Säurebildung gerade dieses Stammes zunächst ein Absinken vom Anfangs- $p_H$  5,8 bis zu  $p_H$  3,5 bis 4,0. Mit der einsetzenden Autolyse und der dabei erfolgenden Ammoniakentwicklung wurde die Lösung wieder weniger sauer, um in einigen seltenen Fällen den Neutralpunkt zu erreichen. Meistens stellte sich jedoch ein End- $p_H$ -Wert von 6,6—6,8 ein. Zur  $p_H$ -Messung diente Lyphanpapier.

Dem so gewonnenen Autolysat wurde als Vergleichslösung eine Na-humat-Lösung des Bodens gegenübergestellt, die durch Extraktion von humoser Garten- bzw. Komposterde mit NaF (1%) gewonnen worden war. Dabei wurden die von SOUCLANGE angegebenen Arbeitsvorschriften genau eingehalten. Zur Reinigung wurde die Extraktion mehrfach in verdünnter Salzsäure ausgefällt und in 1% NaF wieder gelöst.

Als Vergleichsmaßstab diente bei quantitativen Bestimmungen stets die Trockensubstanz, deren Werte bei verschiedenen Autolysatproben in einem geringen Schwankungsbereich von 0,67—0,75% lagen. Größere Unterschiede zeigten sich bei den Bodenextraktionen je nach der Bodenart und dem Extraktionsmittel. Als solche dienten 1% NaF oder 0,5% NaOH. Der zu den meisten Versuchen verwandte Bodenextrakt wurde durch Zugabe der 10fachen Menge des Extraktionsmittels (1% NaF) aus Gartenerde gewonnen. Die hierin bestimmte Trockensubstanz von 1,16% wurde als Vergleichswert für die weiteren Versuche herangezogen. Die oxydimetrische Huminsäurebestimmung erwies sich zur Festlegung des Einheitsmaßes als nicht geeignet, da jedes *Asp.*-Autolysat, auch wenn es unter den gleichen Kulturbedingungen hergestellt war, sehr unterschiedliche Werte zeigte. Diese Werte waren ein Zeichen dafür, daß in jedem Kolben des gleichen Versuches verschiedene Mengen reduzierend wirkender organischer Stoffe durch den Pilz gebildet wurden. Die verschiedenen Bodenextraktionen zeigten nur wenig unterschiedliche Werte.

### Vergleich zwischen Boden- und Pilz-Humus.

Humusstoffe lassen sich als braunschwarzer Niederschlag durch Mineralsäuren ausfällen, in Laugen wird der Niederschlag — ein besonderes Kennzeichen dieser Stoffgruppe — wieder gelöst. Um bei gleicher Lösungsmenge eine vollständige Ausfällung zu erhalten, mußte beim Autolysat etwa die 3—4fache Menge an verdünnter (25%iger) Salzsäure verwandt werden. Nach Reinigung und Trocknung im Vakuum bei 30—40° ergaben sich sehr unterschiedliche Werte im Gewicht der getrockneten Ausfällungen:

250 cm <sup>3</sup> Ausgangslösung Autolysat:	6,2 mg
250 cm <sup>3</sup> „ Bodenlösung:	13,7 mg.

Durch Abzug der N-Gehalte des Filtrates und des Waschwassers vom Gesamt-Stickstoff der Ausgangslösung wurde indirekt der N-Gehalt des Rückstandes bestimmt; so ergaben sich folgende Werte:

N-Gehalt in Prozent der Trockensubstanz des Rückstandes

Autolysat:	27,20%
Bodenlösung:	4,32%



Die hohe Zahl beim Autolysat ist wohl auf Beimengungen und leicht lösliche Stoffe im doch nur unvollkommen gereinigten Präparat zurückzuführen.

Die getrockneten Niederschläge beider Proben waren sich, rein äußerlich gesehen, sehr ähnlich, tiefschwarz mit einem glimmrigen Glanz an der Oberfläche und fettglänzenden Bruchstellen. Im getrockneten Zustand verlieren die Ausfällungen ihre Fähigkeit, sich in Wasser, Alkohol und anderen organischen Stoffen zu lösen. Dies unterscheidet die echten Huminsäuren von ihren Vorstufen. Während die getrocknete Bodenausfällung sowohl in kaltem als auch erwärmtem Wasser und Alkohol vollkommen unlöslich war, war bei der getrockneten Autolysatfällung noch eine leichte Alkohollöslichkeit nach Erwärmen festzustellen.

Es war in unserem Falle unmöglich, die Farbe der Ausgangslösungen für einen Vergleich und eine Huminsäurebestimmung heranzuziehen. Trotz gleicher Kulturbedingungen zeigte jede Autolysatprobe nicht nur eine schwankende Farbtiefe, sondern auch eine andere Farbart. Von rötlich-braun, dunkelbraun, grünlich-schwarz bis zu schwarz waren alle Farbtönungen vertreten. Im durchfallenden Licht machte das Autolysat den Eindruck einer unklaren, dunkelbraun-grünlich gefärbten Lösung, obwohl es mehrfach sauber filtriert war. Die verschiedenen Bodenextraktionen dagegen waren stets dunkelbraun-schwarz und im durchfallenden Licht dunkelrot-braun und klar. Auch bei Übereinstimmung der Konzentration und der  $p_H$ -Zahl hatten die beiden Vergleichslösungen nicht die gleiche Farbe.

Bei LAATSCH (1944, S. 75 u. 81) sind einige Angaben über das Chromatographieren von künstlichen Huminsäuren zu finden. Danach werden im oberen Teil einer neutralen Aluminiumoxydsäule die hochmolekularen dunkelgefärbten Huminsäuren adsorbiert und darunter die niedrigmolekularen helleren Huminsäurevorstufen.

Bei Anwendung der chromatographischen Adsorptionsmethode auf meine beiden Vergleichslösungen ergaben sich ähnliche Verhältnisse. Dazu wurden je 10 cm<sup>3</sup> Lösung gleicher Konzentration durch ein Quarzrohr, das mit neutralem Aluminiumoxyd (standardisiert nach BROCKMANN) gefüllt war, hindurchgesaugt. Beobachtet wurde in natürlichem und in ultraviolettem Licht. Im Chromatogramm wurden oben in einer Breite von 2—3 cm die dunklen Stoffanteile mit zunehmender Farbtiefe nach unten adsorbiert, um sich dann in einem scharfen Trennungsstrich von dem darunter liegenden helleren Anteil abzusetzen (Abb. 1).

Beide Lösungen stimmen also ziemlich gut überein, abgesehen von der verschiedenen Breite des Farbbandes, die man mit dem höheren Alter und der entsprechenden Anreicherung der dunklen echten Humusstoffe im Boden erklären kann.

Wie sehr das Alter für die Bildung von Humusstoffen eine Rolle spielt, konnte auch bei einem Vergleich der beiden Lösungen hinsichtlich des prozentualen Anteils der verschiedenen N-Fractionen am Gesamt-

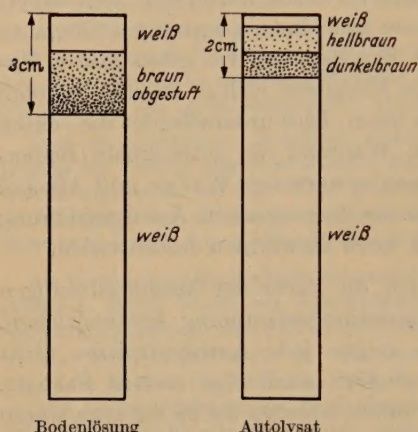


Abb. 1. Chromatographischer Vergleich mit der Aluminiumoxyd-Säule von Boden- u. Pilz-Humus.

N-Gehalt beobachtet werden. Im Autolysat wurde noch ein, wenn auch geringer Anteil an Amid- und Amino-Stickstoff bestimmt, der in der Bodenlösung vollkommen fehlte. Man muß also annehmen, daß die Umsetzung dieser Stoffe im Boden bereits so weit fortgeschritten ist, daß sie nicht mehr in Erscheinung treten, während im Autolysat dieses Stadium der Entwicklung noch nicht erreicht ist. In der Bodenlösung fand sich nur Ammoniak, das etwa zu gleichen Teilen mit einem unbestimmbaren Rest an der Zusammensetzung des Gesamt-Stickstoffs beteiligt war. Bei der Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs und der einzelnen N-Fractionen wurden folgende Werte erhalten (Tab. 1):

Tabelle 1. Stickstoff-Formen im Boden- und Pilz-Humus.

	Autolysat A	Autolysat B	Bodenlösung
Gesamt-N . . .	38,516 mg% = 100	30,261 mg% = 100	8,646 mg% = 100
Ammoniak-N .	18,012 mg% = 46,68	12,969 mg% = 42,85	4,323 mg% = 50
Amid-N . . . .	2,882 mg% = 7,47	2,357 mg% = 7,57	—
Amino-N . . . .	0,718 mg% = 1,86	2,058 mg% = 6,80	—
Heterocyclischer			
Kernstickstoff	16,934 mg% = 43,99	12,877 mg% = 42,57	4,323 mg% = 50

Die Werte beziehen sich auf die Lösungen.

Der Gesamt-Stickstoff wurde nach KJELDAHL bestimmt, der Amino-N nach v. SLYKE; vor und nach einer Säurehydrolyse wurde mit MgO destilliert und auf diese Weise der Ammoniak-N bestimmt und als Differenz der Amid-N berechnet. Bei allen Autolysat- und Bodenproben blieb ein nicht unerheblicher Rest vom Gesamt-Stickstoff übrig, der nicht genauer bestimmt werden konnte. In beiden Vergleichslösungen wurden sowohl Phenole als auch Indol nachgewiesen. Der Nachweis der Phenole erfolgte mit Eisen(III)-chlorid (schwache Reaktion) und durch eine Reaktion mit diazotierter Sulfanilsäure, die zu hellrotbraunen Azo-



farbstoffen gekuppelt wird (nach REUSS). Die Indolprobe wurde nach KOVACS mit p-Dimethyl-amino-benzaldehyd und Amylalkohol durchgeführt. Es ist anzunehmen, daß dieser Reststickstoff heterocyclisch gebunden ist. SUECHTING und RIPPEN vermuteten auch, daß der Stickstoff im Humus in heterocyclischer Bindung vorliegen müsse, da er durch biologische und chemische Einflüsse sehr schwer angreifbar ist. DOJARENKO fand zwar in humusreichen Schwarzerden eine andere Aufteilung des Gesamt-Stickstoffs in 1—2% Ammoniak-N, 40—50% Amino-N und 10% Amid-N, aber auch bei ihm blieb ein Rest von etwa 40% unbestimmbar. In künstlichen Phenolhuminsäuren hat LAATSCH (1944) ein ziemlich konstantes Verhältnis von Ammoniak zu Kernstickstoff von 1,0—1,25:1 festgestellt. Zu ähnlichen Verhältniswerten kommt man, in Übereinstimmung dazu, auch bei den Bestimmungen im Autolysat und in einer NaF-Bodenextraktion. Der annähernd gleich hohe Anteil von Kernstickstoff im Verhältnis zum Ammoniak in den beiden Vergleichslösungen spricht für eine ähnliche chemische Zusammensetzung, soweit es sich um Stickstoffverbindungen handelt.

### Bedingungen der Bildung von Mikroorganismen-Humus.

Bei Kohlenstoffbestimmungen an bewachsenen *Asp.*-Lösungen verschiedenen Alters konnte festgestellt werden, daß nach Abzug des restlichen Glykose-Kohlenstoffs ein Rest an Kohlenstoff bleibt, der ziemlich konstant ist, sowohl in jungen noch nicht autolysierten, als auch in alten sehr stark dunkel gefärbten Lösungen (Tab. 2).

Tabelle 2. Kohlenstoffverteilung in verschieden alten *Aspergillus*-Kulturen.

Alter der Lösung	Gesamt-C-Gehalt in %	davon Zucker-C		Rest-C	
		in %	in % d. Ges.-Lsg.	in %	in % d. Ges.-Lsg.
10 Tage	2,57	89,0	= 2,288	11,0	= 0,282
20 „	0,40	44,1	= 0,177	55,9	= 0,223
35 „	0,20	6,7	= 0,013	93,3	= 0,187
54 „	0,26	—	—	100	= 0,260
70 „	0,30	—	—	100	= 0,300
96 „	0,24	—	—	100	= 0,240

Die Werte beziehen sich auf die Lösungen.

In den jungen *Asp.*-Kulturen des hier verwandten Stammes *Edendorf* hat sich ein intensiv roter Farbstoff gebildet, der, wie sehr viele Pilzfarbstoffe, N-frei ist und Chinoncharakter besitzt. Bei Betrachtung der Tab. 2 wird es einleuchtend, daß es im Verlauf der Autolyse zu keiner wesentlichen Ausscheidung von Kohlenstoffverbindungen kommt, sondern daß lediglich das freiwerdende Ammoniak in das bisher N-freie Farbstoffmolekül eingebaut wird. Der rote Farbstoff wird auf diese

Weise in eine stark dunkelgefärbte humusähnliche Form umgewandelt. Demnach scheint die Bedeutung der Mikroorganismen für die Humusbildung in erster Linie darin zu liegen, daß sie solche Produkte ausscheiden—Chinone usw.—, die durch einen weiteren, rein chemischen Vorgang in dunkle Humusstoffe übergeführt werden können. Für *Asp. niger* müssen dazu verschiedene Bedingungen erfüllt sein: schwache Alkalität des Mediums und starke Sauerstoffzufuhr. Eigene Versuche zeigten, daß der Pilz mindestens 18% O<sub>2</sub> benötigt, um den erwähnten roten Farbstoff zu bilden; da es sich dabei um stark sauerstoffreiche Verbindungen wie Chinone handelt, ist das erklärlich.

*Azotobacter* bietet ein weiteres Beispiel dafür, daß die Dunkelfärbung von Kulturlösungen auf einem erhöhten Vorhandensein von organisch gebundenem Stickstoff in Form von Amino- oder heterocyclischen Verbindungen beruht. Die Beobachtungen von FISCHER, nach denen *Azotobacter* auf Na-benzoat als C-Quelle einen dunklen Stoff in die Nährlösung ausscheidet, ließen dies Objekt für solche Versuche geeignet erscheinen. In den Filtraten von bewachsenen *Azotobacter*-Kulturen wurden folgende Anteile der verschiedenen Stickstoff-Fractionen bestimmt (Tab. 3). Die Bestimmungen erfolgten nach 10tägigem Wachstum auf Glykose- bzw. Na-benzoat-Lösungen.

Tabelle 3. Stickstoff-Fractionen bei Glykose bzw. Benzoat als C-Quelle in *Azotobacter*-Kulturen.

	Glykose	Na-benzoat
Gesamt-N . . . . .	12 969 mg% = 100	11 528 mg% = 100
Ammoniak-N . . . . .	7,926 mg% = 61,03	5,044 mg% = 43,70
Amino-N . . . . .	0,059 mg% = 0,45	1,337 mg% = 11,59
Heterocyclischer Kernstickstoff . .	4,984 mg% = 38,52	5,147 mg% = 44,71

Die Werte beziehen sich auf die Lösungen.

Unter den gleichen Voraussetzungen wie bei den *Asp.*-Kulturen kann auch hier der unbestimmbare Reststickstoff als heterocyclischer Kernstickstoff angesehen werden. Wesentlich scheint die Tatsache, daß in den dunkel gefärbten Na-benzoat-Filtraten ein höherer Anteil an Amino-N und heterocyclischem Kernstickstoff vorhanden ist. Ob jedoch der Organismus solche dunklen Stoffe, die meist aus Ringverbindungen bestehen, leichter bildet und ausscheidet, wenn ringförmige Verbindungen, wie hier das Na-benzoat, als alleinige oder zusätzliche C-Quelle gegeben werden, kann vorerst nur als eine Hypothese gewertet werden. Auch in der dunklen Na-benzoat-Lösung, in der sich beim Ansäuern eine braunschwarze Ausfällung bemerkbar machte, läßt sich, wie in dem *Asp.*-Autolysat und der Bodenextraktion, ein Verhältnis von Ammoniak zu



heterocyclischem Kernstickstoff von 1:1 herauslesen. Anders liegt das Verhältnis bei der Glykoselösung (3:2), bei der auch schon ROBERG nur 50% Ammoniak-N, aber keinen Amino-Stickstoff finden konnte.

### Mikrobiologischer Abbau von Huminen bzw. Autolysaten.

Zum Vergleich wurden die beiden filtrierten Kulturlösungen des eben erwähnten *Azotobacter*-Versuches mit *Asp. niger* beimpft und das Wachstum und besonders die Verwertbarkeit der von *Azotobacter* ausgeschiedenen Stickstoffverbindungen geprüft. Auch ROBERG berichtet von einer Ausnutzung des von *Azotobacter* assimilierten Stickstoffs durch *Asp. niger*. Das Wachstum auf den Filtraten von bewachsenen Glykose- bzw. Na-benzoat-Lösungen (50 cm<sup>3</sup> in 200 cm<sup>3</sup>-Kolben), denen zum Teil noch 5% Glykose zugesetzt wurde, unterschied sich sehr stark. Daß auf den Lösungen mit einer zusätzlichen Zuckergabe die Mycelentwicklung besser war, ist nicht verwunderlich. Erwähnenswert ist noch, daß sich auf allen Na-benzoat-Filtraten ein graues Mycel, auf Glykose-Filtrat dagegen ein weißes bildete. Die Sporenbildung blieb auf Na-benzoat gegenüber Glykose zurück.

Tab. 4 gibt Aufschluß über den Stickstoffverbrauch von *Asp. niger* auf diesen Lösungen nach 10tägigem Wachstum:

Tabelle 4. Verwertung von *Azotobacter*-Filtrat durch *Aspergillus niger*.

Ausgangslösung N-Gehalt	davon NH <sub>3</sub> -N		End-p <sub>H</sub> bei Anfangs-p <sub>H</sub> 6,4	N-Gehalt der Restlösung		folglich verbrauchter N		mehr als NH <sub>3</sub> -N ver- braucher N
in mg	in mg	in %		in mg	in %	in mg	in %	in %
Glykose								
mit Zucker . . 6,48	3,96	60,95	3,7	1,86	28,71	4,62	71,29	10,34
mit Zucker . . 6,48	3,96	60,95	3,7	1,21	18,68	5,27	81,32	20,37
ohne Zucker . . 6,48	3,96	60,95	6,8	1,97	30,56	4,51	69,44	8,49
ohne Zucker . . 6,48	3,96	60,95	6,8	0,89	13,74	5,59	86,26	25,31
Na-benzoat								
mit Zucker . . 5,76	2,52	43,75	4,5	1,71	29,69	4,05	70,31	26,56
mit Zucker . . 5,76	2,52	43,75	4,2	2,51	32,58	3,25	56,42	12,67
ohne Zucker . . 5,76	2,52	43,75	8,2	4,07	70,65	1,69	29,35	—
ohne Zucker . . 5,76	2,52	43,75	7,5	2,93	50,86	2,83	49,14	5,39

Obwohl diese Zahlen wenig ausgeglichen sind, läßt sich daraus doch manches feststellen. Die Filtrate der Glykoselösungen werden mit und ohne Zuckerzusatz in ihrem N-Gehalt ziemlich gleichmäßig zu etwa 10—20% über den Ammoniakgehalt der Anfangslösung hinaus angegriffen. Bei dem Na-benzoat-Filtrat ohne Zuckerzusatz wird entweder der



In der kombinierten Lösung Nr. 5 wurde versucht, das Autolysat in bezug auf seine Stickstoffverbindungen zu „synthetisieren“. Zu diesem Zweck wurde der „Nicht-Ammoniakstickstoff“ in äquivalenter Menge als Nicotin, und das Ammoniak als Ammoniumphosphat geboten. Zu dieser Lösung wurde nun weiterhin noch Glykose zugegeben (Lösung Nr. 6), da der Kohlenstoff im Nicotin für die Ausnutzung des Stickstoffes nicht ausreichte.

Tab. 5 zeigt die Werte für den Stickstoffverbrauch in diesem Versuch. Innerhalb der Parallelen stimmen die erhaltenen Werte gut überein, aber nicht bei Versuchen, die zwar unter den gleichen Bedingungen, aber nicht zu gleicher Zeit durchgeführt wurden (siehe 1a und 1b). Die Werte für den Stickstoff, der außer dem Ammoniak-N angegriffen wird, entsprechen sich gut bei den Lösungen 1a und 5 bzw. 1b und 4. Dies scheint ein weiterer Beweis dafür zu sein, daß im Autolysat organischer, heterocyclisch gebundener Stickstoff vorliegt, der ebenso wie das Nicotin durch diese Spezialisten angegriffen wird. Die Werte für das verbrauchte Nicotin liegen in der mit Ammoniak kombinierten Lösung niedriger als in der reinen Nicotininlösung und übertreffen diese erst bei einer Zuckerzugabe.

Tabelle 5. Verbrauch verschiedener Stickstoff-Formen durch *Proactinomyces citreus* 2.

Ausgangslösung	N-Gehalt in mg	davon $\text{NH}_4\text{-N}$		Anfangs- $\text{pH}$	End-	N-Gehalt der Lösung in mg	N-Verbrauch nach 9 Tagen		mehr als $\text{NH}_4\text{-N}$ ver- brauchter N in %
		in mg	in %				in mg	in %	
1a. Autolysat	4,86	1,00	20,57	6,7	9,7	3,56	1,30	26,54	5,97
„	4,86	1,00	20,57	6,7	9,5	3,07	1,79	30,65	10,08
1b. Autolysat	4,86	1,00	20,57	6,6	8,4	2,67	2,19	45,06	24,49
„	4,86	1,00	20,57	6,6	9,6	2,52	2,34	48,15	27,58
2a. Ammon- phosphat	6,89	6,89	100,00	7,2	6,0	4,32	2,57	37,30	
2b. Ammon- phosphat	6,89	6,89	100,00	7,2	5,8	4,47	2,42	35,12	
2b. Ammon- phosphat	10,59	10,59	100,00	7,2	5,8	7,14	3,45	32,57	
2b. Ammon- phosphat	10,59	10,59	100,00	7,2	5,8	7,78	2,81	26,53	
3a. Nicotin	7,87	—	—	5,6	8,0	7,00	0,87	11,31	11,31
„	7,87	—	—	5,6	7,6	6,92	0,95	12,07	12,07
3b. Nicotin	5,13	—	—	6,8	7,5	4,54	0,59	11,48	11,48
„	5,13	—	—	6,8	7,5	4,47	0,66	12,86	12,86
4. Autolysat durchlüftet	3,86	—	—	6,6	8,4	2,95	0,91	23,57	23,57
4. Autolysat durchlüftet	3,86	—	—	6,6	8,4	2,78	1,08	27,97	27,97
5. Kombiniert	4,93	1,07	21,70	7,0	7,6	3,53	1,40	28,39	6,69
„	4,93	1,07	21,70	7,0	7,6	3,34	1,59	32,25	10,55
6. Kombiniert	4,93	1,07	21,70	6,6	7,2	3,10	1,83	37,11	15,41
m. Glykose	4,93	1,07	21,70	6,6	7,0	2,95	1,98	40,16	18,46

Mit einer Elektivlösung nach SOEHNEN mit Na-humat des Bodens bzw. *Asp.*-Autolysat als einziger C-Quelle wurden aus Garten- und Komposterde verschiedene *Mycobakterien* und *Proaktinomyceten* isoliert. Die meisten der auf diese Weise erhaltenen *Proaktinomyceten* waren gute Nicotinzersetzer. Die *Mycobakterien*, auch die aus der Institutssammlung hinzugezogenen, wuchsen nicht mit Nicotin als einziger C- und N-Quelle. 2 dieser Stämme, *Mycobacterium* Stamm 109 und ein Nicotin-zersetzender *Proactinomyces*-Stamm 141, ebenso der schon oben erwähnte Nicotinzersetzer *Proactinomyces citreus* 2 wurden auf eine NaF-Bodenextraktion geimpft, die nach der anfangs beschriebenen Art gewonnen wurde und der kein Nährstoff zugesetzt worden war. Nach 9 Tagen wurden die Lösungen (25 cm<sup>3</sup> in 250-Kolben) zentrifugiert und in ihnen der Stickstoff bestimmt (Tab. 6).

Tabelle 6. Verwertung des Stickstoffs im Bodenhumus durch *Mycobakterien* und *Proaktinomyceten*.

Stamm	Ausgangslösung			N-Gehalt der Lösung in mg	N-Verbrauch nach 9 Tagen		mehr als NH <sub>4</sub> -N verbraucht. N in %
	N-Geh. in mg	davon NH <sub>4</sub> -N in mg	in %		in mg	in %	
109	2,70	0,54	20,00	1,01	1,69	62,59	42,59
109	2,70	0,54	20,00	1,87	0,83	30,74	10,74
141	2,70	0,54	20,00	1,15	1,55	57,40	37,40
141	2,70	0,54	20,00	1,59	1,11	41 14	21,14
<i>citreus</i> 2	2,70	0,54	20,00	2,31	0,39	14,44	—
<i>citreus</i> 2	2,70	0,54	20,00	2,02	0,68	25,18	5,18

Der p<sub>H</sub>-Wert blieb während der 9tägigen Versuchsdauer konstant (7,6). Die Stickstoff-Verbrauchswerte schwankten für die einzelnen Stämme sehr stark, aber doch ließ sich daraus ersehen, daß die beiden Stämme 109 und 141 im Vergleich zu *citreus* 2 den heterocyclisch gebundenen Stickstoff in der Bodenlösung sehr stark angreifen können. Die Herkunft und Isolierungsmethode scheint für solche Stämme wesentlich zu sein, denn *Proactinomyces citreus* 2, der ebenso wie 141 aus Komposterde stammt, wurde auf andere Weise erhalten (v. PLOTHO).

Da das Bodenhumat durch Extraktion mit Natriumfluorid gewonnen war, so lag die Möglichkeit vor, daß die Ergebnisse dadurch vorgetäuscht waren, zumal besondere Versuche ergeben hatten, daß tatsächlich *Proactinomyceten* gegen diesen Stoff unempfindlicher sind als *Aspergillus niger*. Deshalb wurde erneut ein durch Natronlauge-Extraktion gewonnenes Bodenhumat geprüft, wobei sich jedoch das gleiche Ergebnis herausstellte: Verwertung ohne Zuckerzusatz durch *Proactinomyceten*, keine durch *Aspergillus*.

Bei dem Vergleich verschiedener neugewonnener *Proactinomyceten*- und *Mycobakterien*-Stämme auf *Asp.*-Autolysat, in dem fast 70% des Gesamtstickstoffes als Ammoniak vorlagen, zeigte sich, daß alle Stämme



in ihrem Stickstoffverbrauch innerhalb der Ammoniakgrenze blieben. Je höher also der Ammoniakgehalt einer Lösung ist, um so weniger wird von dem restlichen cyclischen Stickstoff angegriffen. Dieser wird erst dann zum Verbrauch herangezogen, wenn der am leichtesten verwertbare Ammoniakstickstoff erschöpft ist.

Dieselben Versuche wurden auch mit *Asp. niger* durchgeführt, dessen Wachstum sowohl auf einer Bodenhumuslösung als auch auf seinem Autolysat beobachtet wurde. Während erst bei Zugabe von 5% Glykose als zusätzliche C-Quelle zum Autolysat sich *Asp. niger* schwach entwickelte, wurde bei der Bodenhumuslösung selbst nach Zusatz weiterer C- und N-Mengen kein Wachstum festgestellt. Im Autolysat standen also abgesehen von den Kohlenstoffverbindungen alle anderen Nährstoffe zur Verfügung.

RIPPEL/BEHR hatten bereits früher gefunden, daß *Asp. niger* seine von ihm ausgeschiedenen Stickstoffverbindungen im Vergleich zu Pepton-N nur schlecht verwertet. In einem Autolysat, das 7,04% Ammoniak-N enthielt, waren nach ihren Ergebnissen 38,2% des gebotenen Stickstoffs verbraucht worden, also 31% „Nicht-Ammoniakstickstoff“. Verschiedene Autolysatproben mit unterschiedlichem Ammoniakgehalt wurden mit *Asp. niger* beimpft (50 cm<sup>3</sup> in 200 cm<sup>3</sup>-Kolben mit 2,5 g Zuckerzusatz), und in ihnen nach 7tägigem Wachstum der Stickstoffverbrauch bestimmt (Tab. 7).

Tabelle 7. Verbrauch des Stickstoffs im Aspergillus-Autolysat durch diesen Pilz.

	Ausgangslösung	N-Geh. in mg	davon NH <sub>3</sub> -N		Anf.- End- pH		N-Gehalt der Lösung in mg	N-Verbrauch nach 7 Tagen		mehr als NH <sub>3</sub> -N ver- braucher N
			in mg	in %				in mg	in %	in %
mit Zucker	Autolysat 31	18,20	12,43	68,29	6,2	3,2	5,34	12,86	70,66	2,37
	„ 31	18,20	12,43	68,29	6,2	3,2	5,33	12,87	70,72	2,43
	Autolysat 31	12,43	6,25	50,28	6,2	3,2	5,63	6,80	54,71	4,43
	z. T. durchlüft.	12,43	6,25	50,28	6,2	3,2	5,93	6,50	52,30	2,02
	Autolysat 26	15,13	6,48	42,85	6,9	3,6	4,76	10,37	68,54	25,69
	„ 26	1513,	6,48	42,85	6,9	3,6	3,84	11,29	74,62	31,77
	Autolysat 21	9,72	2,00	20,57	6,9	3,6	3,80	5,92	60,91	40,34
ohne Zucker	Autolysat 21	4,63	—	—	6,9	5,0	2,62	2,01	43,42	43,42
	durchlüftet (nur 30 cm <sup>3</sup> Ausgangslösung)									
ohne Zucker	Autolysat	Kein Wachstum								
	Bodenhumus-Lösung	Kein Wachstum								

Auch hier erscheinen wieder dieselben Beziehungen zwischen der Höhe des Ammoniakgehaltes und dem Verbrauch des „Nicht-Ammoniakstickstoffes“ wie schon oben bei dem *Proaktinomyceten*-Versuch. Solange

dem Pilz genügend Ammoniak zur Verfügung steht, werden die organischen Stickstoffverbindungen nicht oder nur sehr geringfügig angegriffen.

### Zusammenfassung.

Die chromatographische Untersuchung von Boden- und Pilzhumus sowie die Bestimmungen der verschiedenen Stickstoff-Fractionen zeigen, daß von *Aspergillus niger* im Verlauf der Autolyse heterocyclische Stickstoffverbindungen ausgeschieden werden, wie sie in ähnlicher Form auch im Bodenumus vorliegen.

Es wurde weiterhin gefunden, daß nur gewisse *Proaktinomyceten*- und *Mycobakterien*-Stämme, die mittels einer besonderen Elektivlösung aus Garten- und Komposterde isoliert worden waren, in der Lage sind, auf *Aspergillus*-Autolysat und Bodenumuslösungen ohne irgendwelche Zusätze zu wachsen. Diese Stämme können also die C-Verbindungen des „Humus“ im Boden und Autolysat abbauen.

Diese Abbaubersuche bestätigen die chemischen Untersuchungen, wonach in dem *Aspergillus*-Autolysat ebenso wie im Bodenumus ein Teil des Stickstoffs in heterocyclischer Bindung vorliegen muß.

### Literatur.

- BEHR, G.: Arch. f. Mikrob. **1**, 418 (1930). — BORTELS, H.: Biochem. Z. **182**, 301 (1927). — DOJARENKO, A.: Landw. Vers. Stat. **56**, 311 (1902). — FISCHER, W.: Diss. math.-nat. Fak. Göttingen 1946. — HORVATH, I.: Arch. f. Mikrob. **13**, 373 (1943). — ITERSON, C. VAN: Zbl. f. Bakt. II **11**, 689 (1904). — JENSEN, H. L.: Proc. Lin. Soc. N. S. W. **59**, 18 (1934). — KOVACS, N.: Z. f. Imm.Forsch. u. exp. Therap. **55**, 311 (1928). — LAATSCH, W.: Dynamik d. dtsch. Acker- u. Waldböden, 2. Aufl. Dresden, Steinkopff 1944. — LAATSCH, W.: Beitr. z. Agrarwiss. Heft III, 1948. — NIKITINSKY, J.: Jahrb. f. wiss. Bot. **37**, 365 (1902). — PLOTHO, O. v.: Arch. f. Mikrob. **14**, 12 (1948). — REINITZER, F.: Botan. Ztg. **58**, 59 (1900). — REUSS, A.: Z. f. Unters. d. Lebensm. **73**, 47 (1937). — RIPPEL, A.: Forsch.-Dienst **2**, 83 (1936). — RIPPEL, A., u. G. BEHR: Arch. f. Mikrob. **6**, 359 (1935). — RIPPEL, A., u. R. WALTER: Biochem. Z. **186**, 474 (1927). — ROBERG, M.: Jahrb. f. wiss. Bot. **82**, 65 (1936). — SÖHNGEN, N. L.: Zbl. f. Bakt. II **37**, 595 (1913). — SOUCL, S. W.: Die Chemie des Moores, Stuttgart, Enke 1938. — SÜCHTING, H.: Z. f. Pflz.ern. Düngg. u. Bdkde. Tl. A, **1**, 113 (1922).

(Aus dem Laboratorium für botanische Mittelprüfung  
der Biologischen Bundesanstalt, Braunschweig<sup>1</sup>.)

## Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien.

### III. Die Vitalfärbung von *Phycomyces Blakesleeanus* mit Acridinorange.

Von

HEINRICH JOHANNES.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. April 1949.)

Untersuchungen über die Vitalfärbung der Zelle niederer Pflanzen liegen nur in geringer Anzahl vor. Als erster färbte PFEFFER (1886) Plasmodien und *Saprolegnien* mit Methylenblau. Fortgeführt wurden die Arbeiten von GUILLIERMOND (1916—1937), MANGENOT (1933), SKUPIENSKI (1929) und STRUGGER (1936, 1941). Als wesentliche Arbeiten über die Speicherung von Vitalfarbstoffen sind die von GROHROCK (1935) und BÜNNING (1936) zu nennen, von denen letzterer auch die sauren Farbstoffe untersuchte. Diese Arbeiten wurden von COLLANDER und VIRTANEN (1938) und KÜSTER (1940) erweitert. Alle die genannten Autoren aber benutzten nur die üblichen Hellfeldfarbstoffe. Fluoreszierende Farben wurden erstmalig von JOHANNES (1939, 1941) in den Dienst der protoplasmatischen Analyse von Pilzmycelien gestellt. WÖSTMANN (1942) verwendete dann die Fluorochrome, aufbauend auf einer Arbeit von JABLOKOWA (1939) zum Nachweis des Mycels von *Ustilago tritici* im Weizenkorn.

Nachdem das Acridinorange durch die Untersuchungen von STRUGGER (1940—1943) eine große Bedeutung für die Protoplasmaforschung erlangt hat, soll im folgenden eine genaue Analyse der Speicherung des Acridinorange bei *Phycomyces Blakesleeanus* vorgenommen werden. Die Ergebnisse werden mit den schon früher (JOHANNES 1939) gewonnenen Erkenntnissen über die Speicherung basischer Farbstoffe durch *Phycomyces* verglichen und kritisch beleuchtet.

Über die Anfärbemethodik der verschiedenen Pilzorgane wird immer in den betreffenden Abschnitten eingehend berichtet. Grundsätzlich wurden alle Färbungen in gepufferten Farblösungen vorgenommen. Als Puffer dienten folgende Lösungen: I. Salzsäure  $n/10$ ; II. primäres Kaliumphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 9,078 g im Liter; III. sekundäres Natriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ): 11,876 g im Liter; IV. tertiäres Kaliumphosphat ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ ): 14,156 g im Liter. Durch geeignete Mischung mit doppelt destilliertem Wasser und den Farblösungen wurden die gewünschten pH-Werte geschaffen und regelmäßig mit der Pt-Wasserstoffelektrode gemessen.

Nach der Färbung des Pilzes wurde die Untersuchung in den farblosen Puffern derselben  $\text{C}_\text{H}$  vorgenommen. Dazu verwandte ich entweder die große Fluoreszenzapparatur von Zeiß-Jena (10 Amp.), eine selbstgebaute Apparatur (13—15 Amp.)

<sup>1</sup> Die Untersuchungen wurden 1944/45 im Botan. Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover begonnen.

oder die vereinfachte Apparatur von Zeiß-Jena mit einem Quecksilberbrenner als Lichtquelle. Zur Bestimmung der Eigenfluorescenz hatte ich die UV-Filter von Schott u. Gen.-Jena mit der Euphospherre zur Verfügung, sonst verwendete ich viel das Blaulicht mit dem Filter BG 1 und BG 2 oder BG 3 mit einer Orangesperre.

## I. Das Keimmycel.

### 1. Methodik.

Schon bei früheren Untersuchungen hatte es sich gezeigt, daß fluorescenz-optische Beobachtungen an gefärbten Agarkulturen nur mit geringen Vergrößerungen vorgenommen werden können. Der Agar adsorbiert die Fluorochrome so stark, daß er nicht nur Feinheiten des Objektes, sondern oft auch das weniger leuchtende Objekt überstrahlt. Wenn man aber sehr dünne Agarschichten verwandte, so bestand meistens die Gefahr, daß sich auf diesem Nährboden nur „Hungermycelien“ entwickelten. Bei den folgenden Untersuchungen wurden die Pilze für die Färbungsanalyse der Keimmycelien auf einem Gummiarabicum-Nährboden gezogen: 3% Malzextrakt und 8% Gummi arabicum wurden in der entsprechenden Menge Wasser verrieben und zur Quellung des Gummis etwa 1 Std stehen gelassen. Je ein Tropfen davon kam in die Mitte eines hohlgeschliffenen Objektträgers, dessen Hohlungsrand mit einem Vaselineering versehen war. Nachdem dieser Nährboden mit einem kleinen Tropfen einer Sporenaufschwemmung beimpft worden war, wurde die Kammer mit einem Deckglas verschlossen. Nach 12—20 Std konnten die Keimmycelien zur Untersuchung verwendet werden.

Die Färbung erfolgte so, daß nach dem Abheben des Deckglases mit einer feinen Pipette einige Kubikzentimeter der gepufferten Farblösung (1:50000) auf den Nährboden gebracht wurden. Nach wenigen Augenblicken hatte sich dieser gelöst, und die ganze Mikrokultur konnte in die Pipette aufgenommen und auf einen neuen Objektträger in einen neuen gepufferten Farbstofftropfen übertragen werden. Um eine Überfärbung der Objekte zu vermeiden, wurde nach der Färbezeit die Farblösung mit dem aufgelösten Gummi arabicum auf der einen Seite des Deckglases abgesogen und von der anderen Seite her durch einen farblosen Puffer derselben  $C_H$  ersetzt.

Nach der Untersuchung habe ich alle Präparate auf Bierwürzeagar abgeklatscht, die Zahl der Mycelien bestimmt und markiert und wenigstens 24 Std weiterbeobachtet, um von jedem Mycel und Färbungsbild eine Kontrolle über die auftretenden Schädigungen zu erhalten.

### 2. Die Analyse.

Schon im Laufe der Vorversuche erwies es sich als wichtig, das Bild in den ersten 2 min nach Beendigung der Färbung festzulegen, denn unter der Einwirkung des UV-Lichtes (auch des Blau-Lichtes) veränderte sich oft schon in kürzester Zeit das Bild, und es traten Schädigungen auf, auf die in einem späteren Abschnitt besonders eingegangen werden soll.

#### a) Die Ergebnisse der „Sofortuntersuchung“.

Sie sind in Tab. 1 übersichtlich zusammengefaßt.

Um die einzelnen Färbungsbilder in den verschiedenen  $p_H$ -Bereichen besser zu übersehen, soll nachfolgende Gruppenbildung gelten:

$$p_H = 2,5-3,1.$$



Durch die hohe Wasserstoffionenkonzentration treten sehr viele Plasmoptysen auf. Solche Keimmycelien wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Das war um so leichter möglich, als sie ja durch ihr grau-grün, selten kupferrot gefärbtes Protoplasma schnell und einwandfrei zu erkennen waren. Das Auffinden der lebenden Mycelien machte

Tabelle 1. *Phycomyces Blakesleeanus*.

Färbung der Keimmycelien mit Acridinorange 1:50000.

pH	Membran			Plasma	Kern		Vacuole	
	Sporenhaut	ältere Hyphen	Hyphen-spitzen		Caryosom	Grundsubst.	Färbung	Kontraktion
2,86	J ((+)) graugrün	J ((+)) graugrün	J ((+)) graugrün	—	—	—	—	—
3,21	++ kupferrot	++ kupferrot	++ kupferrot	—	—	—	—	—
3,36	+++ kupferrot	+++ kupferrot	+++ kupferrot	—	—	—	—	—
5,20	+++ kupferrot	+++ kupferrot	+++ kupferrot	—	—	—	—	—
5,71	+++ kupferrot	+++ kupferrot	+++ kupferrot	(+)	((+))	—	—	—
6,24	+++ kupferrot	+++ kupferrot	++ kupferrot	blaugrün +	gelbgrün (+)	—	—	—
6,69	+++ kupferrot	+++ kupferrot	(+) orange	+++ grün	+++ gelbgrün	—	—	((+))
6,90	++ orangerot	++ orangerot	—	+++ grün	+++ gelbgrün	—	—	((+))
7,23	+ orange	+ orange	—	+++ grün	+++ gelbgrün	—	—	(+)
7,84	? ?	((+)) orange	—	+++ grün	+++ gelbgrün	+	—	+
8,89	—	—	—	+++ grün	+++ gelbgrün	grün	+	++
9,58	—	—	—	+++ grün	+++ gelbgrün	++ grün	+	+++
10,01	—	—	—	+++ grün	+++ gelbgrün	++ grün	orange rot	+++
über 10,00	—	—	—	+++ grün	+++ gelbgrün	++ grün	++ rot	+++

Erläuterungen: Die Färbungsintensitäten sind durch Kreuze bezeichnet: ((+)) kaum erkennbare Färbung, (+) Färbung sehr schwach, + Färbung schwach, ++ Färbung gut sichtbar, +++ Färbung sehr stark und leuchtend. J = Imbibitionsfärbung. Die Intensität der Vacuolenkontraktion ist entsprechend den Färbungsintensitäten durch Kreuze gekennzeichnet.

aber in diesem Bereich einige Schwierigkeiten und mußte oft im Hellfeld vorgenommen werden, denn in dem sauren Gebiet speichern nicht einmal die Membranen den Farbstoff; ihre schwache, graugrüne Imbibitionsfärbung ist sehr schwer zu erkennen.

Das Bild ändert sich aber schon erheblich im nächsten Bereich:

$$p_H = 3,1-5,5.$$

Alle Membranen zeigen eine stark leuchtend kupferrote Fluoreszenz. Es ist dabei gleich, ob es sich um eine alte Sporenhaut, die älteren oder jüngeren Hyphen handelt. Diese Färbung ist vollkommen unschädlich, wie die Kulturversuche einwandfrei ergaben.

$$p_H = 5,5-8,0.$$

Noch bis  $p_H = 6,0$  etwa bleiben die starken Membranfärbungen bestehen, dann werden erst die Membranen der jungen Spitzen heller, orangerot, um dann endlich gegen  $p_H = 6,9$  hin ganz zu verschwinden.

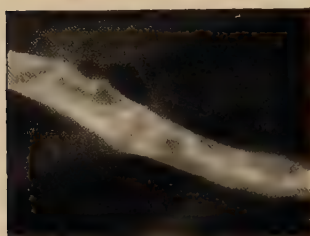


Abb. 1. Fluoreszenzaufnahme eines Keimmycels von *Phycomyces*, dessen Plasma und Kerne mit Acridinorange 1:50000  $p_H = 6,83$  vital gefärbt sind.

Hier finden wir eine Parallele zu den Färbungsergebnissen mit Neutralrot (JOHANNES, 1939). Die Membranfärbung der älteren Hyphenteile und der Sporenhaut nimmt erst mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration bis  $p_H = 8,0$  je nach ihrem Alter ab.

Mit dem Verschwinden der Membranfärbung beginnt das Innere des Pilzes aufzuleuchten. Anfangs tritt eine sehr schwache blau-grüne, diffuse Färbung im Protoplasma auf, die natürlich nur ganz eindeutig in den jungen Hyphen zu erkennen ist, weil hier mit dem Abnehmen der Membranfärbung ein besserer Einblick möglich ist.

Von  $p_H = 6,5$  ab fluoresciert das Plasma stärker grün. Jetzt ist es auch in den älteren Hyphen durchschimmernd zu erkennen, und man sieht bei genauerer Betrachtung seine fädige Struktur, wie sie am besten die Abb. 1 wiedergibt und wie sie im Phasenkontrastbild ohne jede Färbung bestätigt werden konnte. Diese diffuse Plasmafärbung tritt in allen nun folgenden  $p_H$ -Bereichen weiterhin in grüner Farbe auf.

Etwa zur selben Zeit, wenn sich das Plasma färbt, beginnen auch die Caryosome der Kerne das Acridinorange zu speichern. Der Farbton ist heller, so daß ein Erkennen möglich ist. Im einzelnen soll auf die Kernfärbung im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden. Vereinzelt ist Vacuolenkontraktion schon erkennbar.

$$p_H = 8,0-9,5.$$

In diesem Bereich herrschen grüne Plasma- und Kernfärbung vor. Doch deutet Vacuolenkontraktion darauf hin, daß auch die Vacuolen schon Farbstoff gespeichert haben. Auch die normale fädige Struktur des Plasmas mit den darin eingebetteten Kernen ist nicht mehr deutlich.

Das Plasma ist ganz leicht „vakuolisiert“, zeigt feinschaumige Struktur und läßt die Plasmaströmung vermissen. Die Kerne treten deutlicher als bisher hervor, und die Caryosome färben sich oft schon leicht gelblich. Es scheint auch, als ob sich die Kernmembran abhebt. Bei der Kleinheit der Kerne ist das aber schwer zu beurteilen.

$$p_H = 9,5-11,6.$$

Das Plasma zeigt keine Farbänderung bei den Kurzfärbungen. Die Kerne erhalten neben den hellen Caryosomen jetzt eine grünliche Grundsubstanz, die bisher nur als dunkler Hof zu erkennen war. Die Kerne erscheinen recht groß, sind aber wahrscheinlich schon etwas blasig aufgequollen. Die Plasmaströmung ist, wie im Bereich  $p_H = 8,0$  bis  $9,5$ , sehr selten zu bemerken, und die Struktur des Plasmas deutet auf geringe, sicher noch reversible Ausflockungen hin. Die Vacuolen speichern den Farbstoff diffus rötlich oder rot, über  $p_H 10,0$  sogar kupferrot in der Farbe der Membranen in den sauren Bereichen. Doch hält diese diffuse Färbung nicht lange vor, sehr schnell entmischt sich der Zellsaft, und die entstehenden Farbtröpfchen sammeln sich an den Enden der Vacuolen zu Kappen. Die weiteren Veränderungen bewirken dann meist schon erhebliche Schädigungen. Mit der Vacuolenfärbung geht eine sehr starke Vacuolenkontraktion einher.

#### b) Die Kerne.

Wie ich schon im vorhergehenden Abschnitt zeigte, färben sich von  $p_H = 5,5$  an auch die Caryosome der Kerne des *Phycomyces* mit Acridinorange. Die Färbung ist im schwach sauren Bereich unschädlich, d. h. bei mäßiger Bestrahlung mit Blau-Licht oder UV-Licht ist es möglich, Keimmycelien, deren Kern-Caryosome gefärbt sind, zu normalen Mycelien heranwachsen zu lassen. Auch die Mycelien beider Geschlechter, deren Plasma und Kerne im schwach sauren Bereich gefärbt sind, bilden normale Kopulationsorgane und Zygoten. Schädigungen treten hier nur auf, wenn das Wachstum unter stärkerem Lichteinfluß vor sich geht. Eine Bestrahlung bis zu 200 Lux läßt die photodynamische Wirkung des Farbstoffes noch nicht zur Geltung kommen.

Zur Untersuchung der Kernstrukturen eignet sich am besten eine gepufferte Farblösung 1:50000 vom  $p_H = 7-8$ . Schon nach wenigen Sekunden Färbezeit zeigt das Plasma eine leuchtend grüne Fluoreszenz, und in ihm sind die hellgrün fluorescierenden Caryosome der Kerne

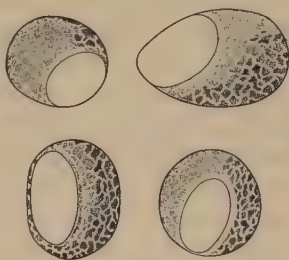


Abb. 2. *Phycomyces Blakesleeanus*, Kerne. Oben: häufigste Ansichten. Unten: seltenere Ansichten.

leicht zu erkennen. Der feinere Bau der *Phycomyces*-Kerne ist in Abb. 2 dargestellt. Es handelt sich hier um einen typischen Protistenkern, wie er von BELAR (1926, S. 307, Fig. 253) von *Achlya*, *Ancylistes*, *Albugo*, *Mucor*, *Empusa* und *Basidiobolus* dargestellt ist. Charakteristisch für den *Phycomyces*-Kern ist, daß das Caryosom immer exzentrisch liegt. Teilweise ist es dann als Ellipsoid oder Paraboloid erkennbar. Ich habe nie gefunden, daß es die zentrale Stellung einnahm, wie bei den großen Kernen von *Basidiobolus ranarum*. Die Kerne der *Foraminiferen* zeigen eine ähnliche exzentrische Lage des Caryosoms.

Bei der Färbung mit Acridinorange ist das Caryosom stets homogen gefärbt, und zwar in denselben  $p_H$ -Bereichen wie das Plasma. Die Kerngrundsubstanz dagegen, die das Acridinorange erst von  $p_H = 8$  ab aufnimmt, ist von inhomogenem, scholligen Bau (Schädigungen). Wenn auch die Kerne größer sind als bisher angenommen wurde und sie durch Quellung im alkalischen Bereich noch größer werden, so ist es doch nicht leicht, Einzelheiten über die Struktur der Ruhekerns auszusagen. Erschwert wird es dadurch, daß bei den genannten Quellungen jede Struktur verschwindet.

Die Verteilung der Kerne in den Hyphen scheint keinem Gesetz zu unterliegen. Fast regellos liegen sie im Plasmabelag. Immer wiederkehrend aber findet man, daß mindestens ein Kern an der Spitze wachsender Hyphen liegt, bzw. dort, wo Seitenzweige an älteren Hyphen gebildet werden.

### c) Nekrosen.

Im folgenden Abschnitt soll kurz auf die Färbungsbilder eingegangen werden, die durch Bestrahlung mit UV- oder Blau-Licht entstehen und die besonders im alkalischen Bereich als Nekrosen anzusehen sind, weil sie immer zum Zelltode führen. Nicht in allen  $p_H$ -Bereichen ist die Einwirkung des Lichtes gleich stark. So schädigt z. B. eine einstündige Bestrahlung von UV- oder Blau-Licht im sauren Bereich bei  $p_H = 3-4,5$  die Mycelien mit einer Membranfärbung verhältnismäßig wenig. Wohl wird das Wachstum sistiert, doch ist diese Schädigung innerhalb einiger Stunden reversibel; die Keimmycelien wachsen zu normalen Kulturen heran. Schwerer und gar irreversibel ist die photodynamische Wirkung im schwach sauren und alkalischen Bereich. Hier lassen sich die plasmatisch grünen Keimmycelien auch im Dunkeln nicht immer ganz normal weiterkultivieren, und schon kürzere Bestrahlungen mit kurzwelligem Licht führen zum Absterben der Zellen. An einigen Beispielen soll das näher beschrieben werden:

1. Ein junges Keimmycel, etwa 24 Std alt, bereits vor 19 min bei  $p_H = 6,24$  2 min lang gefärbt, wächst in diesem Zustand im Präparat im Dunkeln und zeigt folgendes Färbungsbild (vgl. dazu Tab. 2). Die



Tabelle 2. *Phycomyces Blakesleanus*. Nekroseerscheinungen an Keimmycelien, die bei  $p_H = 6,24$  gefärbt wurden.  
(Färbungsintensitäten entsprechend der Tab. 1.)

Minuten		Membran			Plasma			Kern		Vacuole		
Färbezeit	Bestrahlung m. Blaulicht	Sporen- haut	alte Hyphen	junge Hyphen	Färbung	Konfiguration	Strömung	Grund- substanz	Caryosom	diffus	Tröpf- chen	Kon- traktion
19	0	+++ kupferrot	+++ kupferrot	(+) orangerot	+	fädig	+++	+	hellgrün	—	—	—
22	3	+++ kupferrot	++ kupferrot	(+) orangerot	++ hellgrün	fädig	+++	++ hellgrün	(+) gelbgrün	—	—	—
27	8	++ kupferrot	++ orangerot	—	++ hellgrün	klein schaumig	(+)	++ hellgrün	+	—	—	—
32	13	++ kupferrot	++ orangerot	—	++ gelblich	stark schaumig	—	++ gelbgrün	++ gelb	—	—	—
35	16	++ kupferrot	++ orangerot	—	++ gelb	grob schaumig	—	++ gelbgrün	++ rosa	—	—	—
37	18	++ kupferrot	++ orangerot	—	++ rötlich	sehr grob ausflockend	—	++ gelb	++ rot	—	—	—
40	21											

alles ist homogen kupferrot gefärbt

Tabelle 3. *Phycomyces Blakesleanus*. Nekroseerscheinungen an Keimmycelien, die bei  $p_H = 9,24$  gefärbt wurden.  
(Färbungsintensitäten entsprechend der Tab. I.)

Minuten		Membran			Plasma		Kern		Vacuole			
Färbezeit	Bestrahlung mit Blaulicht	Sporen- haut	alte Hyphen	junge Hyphen	Färbung	Strömung		Grund- substanz	Caryosom	diffus	Tröpfchen	Kontraktion
						Konfiguration						
17	0	—	—	—	+++ grün	fädig ?	++	++ grün	++ grün	+++ kupferrot	—	+++
19	2	—	—	—	+++ grün	fein schaumig	(+) ?	++ grün	++ gelbgrün	+++ kupferrot	—	+++
21	4	—	—	—	+++ grün	schaumig	—	++ hellgrün	++ gelb	++ orangerot	+	+++
23	6	—	—	—	+++ hellgrün	grob schaumig	—	++ gelbgrün	+	—	++ gelbrot kupferfbg.	+++
24	6½	—	—	—	+++ gelblich	grob ausflockend	—	++ gelbgrün	+	—	++ gelbrot	+++
	7	—	—	—	+++ gelb	ausgeflockt	—	++ gelb	++ rot	—	dringen durch Tonoplast ins Plasma	+++
	7½	—	—	—								

homogen kupferrot gefärbt

homogen kupferrot gefärbt

Sporenhaut und ältesten Hyphen leuchten mit starker Membranfärbung kupferrot. Die jungen Hyphen dagegen sind nur schwach orangerot gefärbt, aber ihr Plasma leuchtet schwach grün. In der fädigen Struktur des Plasmas, das sich in Strömung befindet, sind die Kerne hellgrün eingebettet. Es ist das typische Bild eines normal wachsenden Mycels. Nach 3 min Bestrahlung nimmt die Färbung der alten Hyphen merklich ab, Plasma- und Kernfärbung verstärken sich; noch bleiben die Plasmaströmung und die normale fädige Struktur erhalten. Nach 8 min Einwirkung des Blau-Lichtes verliert die Sporenhaut etwas an Farbintensität, und die jungen Hyphen zeigen nur noch hellgrüne, aber stärkere Plasmafärbung. Auch die Kerne sind deutlicher geworden; das bisher grüne Caryosom wird gelb-grün. Eine Plasmaströmung ist nur noch in seltenen Fällen nachweisbar, und aus dem fädigen Protoplasma wird eine klein-schaumige Masse. In diesem Zustand sind die Schädigungen noch reversibel, d. h. dieses Plasma ist befähigt, im Dunkeln seine normalen Funktionen wieder aufzunehmen. Nach 13 min Einwirkung kurzweiligen Lichtes werden die Schädigungen irreversibel und führen jetzt schnell zum Zelltod. Die Plasmafärbung wird gelblicher, die Caryosome der Kerne leuchtend gelb, Plasmaströmung fehlt, das Plasma ist stark-schaumig. Nach weiteren 3 min wird es sogar grob-schaumig und gelb, die Caryosome der jetzt gelb-grünen Kerne leuchten rosa und werden nach 18 min Bestrahlung leuchtend rot in der gelben Grundsubstanz, das Plasma färbt sich rötlich und beginnt grob-körnig auszuflocken. Nach 21 min ist alles homogen kupferrot gefärbt, sofern noch genügend Farbstoff im Präparat vorhanden war. Das Mycel ist abgestorben.

2. Viel schneller verläuft der eben geschilderte Vorgang, wenn es sich um Keimmycelien handelt, die im stark alkalischen Bereich angefärbt wurden. Im angeführten Beispiel sind Keimmycelien 2 min lang bei  $p_H = 9,24$  gefärbt worden und wuchsen so schon 17 min im Dunkeln (Tab. 3). Das Bild, das sich ohne Bestrahlung noch einige Zeit erhalten würde, zeigt neben einer intensiven Plasma- und Kernfärbung eine diffuse, kupferrot leuchtende Vacuolenfärbung. Die Struktur des Protoplasmas ist nicht mehr in allen seinen Teilen fädig, denn starke Vacuolenkontraktion hat besonders in den jungen Hyphen diese Konfiguration zerstört. Auch die Plasmaströmung ist verhältnismäßig schwach und nicht immer mehr nachzuweisen. Trotz allem aber wären auch diese Mycelien in völliger Dunkelheit noch kultivierbar. Schon nach 2 min Bestrahlung nimmt das Plasma fein-schaumige Struktur an, die Plasmaströmung hört ganz auf, die Caryosome der Kerne werden gelb-grün. Nach 4 min entmischen sich die Vacuolen und kleine orangerote Tröpfchen bewegen sich mit Brownscher Molekularbewegung im Zellsaftraum. Nach 6 min ist das Plasma grob-schaumig geworden, die Kerne gelb-

grün mit rosa Caryosom, die diffuse Färbung der Vacuolen hat sich vollständig entmischt, und die gelb-roten Tröpfchen sammeln sich kappenförmig an ihren beiden Enden. Eine halbe Minute später flockt das Plasma grob-körnig aus, die Caryosome werden rot, und nach 7 min Bestrahlung dringt der Farbstoff der Vacuole durch den Tonoplasten hindurch in das Plasma, das sich fast schlagartig gelb und rot färbt. Wenige Sekunden später ist dann das Mycel abgestorben und leuchtet kupferrot ohne jede Differenzierung.

3. Keimmycelien, die etwa bei  $p_H = 11$  angefärbt wurden, sterben in noch schnellerer Zeit ab. Wohl treten die soeben beschriebenen Färbungsbilder und Entmischungsstufen auf, doch kann dann dieser Vorgang schon in 10—30 sec ablaufen.

## II. Die Spore.

### 1. Die ungequollene Spore.

#### a) Kurzfärbungen.

Nachdem wir bei der Färbung des Keimmycels gesehen haben, daß die alte Sporenmembran immer bis weit in den alkalischen Bereich hinein noch die Ionen des Acridinoranges speicherte, ist es von Interesse, die Färbung der ungequollenen Sporen näher zu analysieren. Zur Methodik sei folgendes gesagt:

In einem kleinen Röhrchen wurde eine Sporenaufschwemmung einer Kultur des *Phycomyces*, die mindestens 10 Tage alt war, in Acridinorange 1:50000 verschiedener  $p_H$ -Werte in doppelt destill. Wasser hergestellt. Ein Tropfen dieser Aufschwemmung wurde im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es ist dabei wiederum darauf zu achten, daß die Farbe im Überschuß vorhanden ist, um gegebenenfalls totes Plasma vom lebenden unterscheiden zu können.

Die Ergebnisse der Kurzfärbungen von 2—15 min sind in Tab. 4 zusammengestellt. Sie zeigen, daß bis zu einem  $p_H$ -Bereich von  $p_H = 6,0$

Tabelle 4. *Phycomyces Blakesleeanus*.

Kurzfärbungen ungekeimter Sporen mit Acridinorange 1:50000.

(Färbungsintensitäten entsprechend der Tab. 1.)

$p_H$	Membran	Plasma	Kern		Vacuole
			Caryosom	Grundsubstanz	
2,80	—	—	—	—	—
3,18	—	—	—	—	—
3,42	—	—	—	—	—
6,16	—	((+))	—	—	—
7,06	—	(+)	((+))	—	—
7,74	—	+	+	(+)	—
10,30	—	+++	+++	+++	—



keinerlei Färbung sichtbar wird. Erst bei  $p_H = 6,16$  tritt in wenigen Sporen eine blaß-grüne Plasmafärbung auf, die sich um  $p_H = 7,0$  herum um wenigstens verstärkt. Zugleich färbt sich das Caryosom der Kerne schwach gelb, während die Grundsubstanz noch unsichtbar bleibt. Diese wird erst deutlich bei etwa  $p_H 7,7$ . Wenn auch schwach, so ist sie doch einwandfrei gegenüber dem jetzt stärker leuchtenden Caryosom und Plasma zu erkennen. Noch weiter zum alkalischen Bereich hin verstärkt sich die Färbung des Plasmas, des Caryosoms und der Kerngrundsubstanz. Auffallend ist: 1. daß sich bei diesen „Kurzfärbungen“ im sauren Bereich nie eine Membranfärbung zeigt und 2. im alkalischen Bereich nie eine Vacuolenfärbung sichtbar wird, obwohl in jeder Spore wenigstens eine Vacuole vorhanden ist.

Um diesen beiden offenen Fragen nähere treten zu können, wurden längere Färbungen vorgenommen. Bei diesen „Langfärbungen“ fand ich verschiedene Färbungstypen, die eingangs kurz zusammengestellt sein mögen:

- I. *Ungefärbt*: Nur im Hellfeld erkennbar, da keine Eigenfluorescenz (primäre Fluorescenz) vorhanden.
- II. *Grün*:
  - a) keine Membranfärbung, Plasma blau-grün, Kerne sehr schwach zu sehen.
  - b) Rostrote Membranfärbung, Plasma grün, heller als bei a), Kerne hellgrün, deutlich das Caryosom; die Grundsubstanz ist wie das Plasma gefärbt, daher erscheinen die Kerne sehr klein, denn nur das Caryosom fällt auf.
- III. *Gelb*: Keine Membranfärbung, Plasma hellgrün bis gelb, Kerne gelb, oft schon mit rosa Caryosom.
- IV. *Orange*: Keine Membranfärbung, Plasma orangerot, Kerne gelb, Caryosom rot.
- V. *Rot*: Keine Membranfärbung, gesamter Inhalt der Sporen rot ohne jegliche Differenzierung der Organzellen.

#### b) Färbungen von 1 Std.

Ließ ich die Sporenaufschwemmung 1 Std lang in einer gepufferten Acridinorangelösung 1:50000 verschiedener  $p_H$ -Werte und untersuchte dann, so zeigten sich die Färbungsergebnisse, wie sie in der linken Hälfte der Tab. 5 dargestellt sind, d. h. bis etwa zum Neutralpunkt ist bei weitem der höchste Prozentsatz der Sporen ungefärbt, und erst zum alkalischen Bereich hin nehmen die Färbungstypen II—V zu. Ein Vergleich mit den „Kurzfärbungen“ zeigt wohl eine Übereinstimmung, doch scheint den Färbungstypen III und IV besondere Bedeutung zukommen. So wurden von jedem untersuchten Präparat zur selben Zeit auch Malzagarplatten beimpft und nach etwa 24 Std ausgezählt, wieviel Sporen gekeimt waren und wieviel nicht. Die Ergebnisse sehen wir in der rechten Hälfte der Tab. 5 zusammengestellt. Aus ihnen ist deutlich zu entnehmen, daß die Färbungstypen I (ungefärbt) und II

Tabelle 5. *Phycomyces Blakesleeanus*.

## Zählung und Wachstumskontrolle gefärbter Sporen.

Angefärbt am 3. 10. 44, 16.30 Uhr in AO 1:50000.

Ausgezählt am 3. 10. 44 bis 17.50 Uhr.

Geimpft sofort nach Auszählung bis 17.50 Uhr.

Platten ausgezählt am 4. 10. 44 21.00 Uhr.

pH	Färbungen in %					Wachstum in %	
	ungefärbt	grün	gelb	orange	rot	gekeimt	nicht gekeimt
2,86	99	1	—	—	—	100	—
2,89	99	1	—	—	—	100	—
6,40	91	9	—	—	—	100	—
7,29	78	20	1	—	1	100	—
8,46	—	27	35	32	6	30	70
10,12	—	6,5	14,5	71,5	4,5	37	63

(grün) wirklich lebende Sporen darstellen und daß mit den Färbungstypen III (gelb) bis V (rot) irreversibel geschädigte Sporen, die nicht mehr auskeimen, erfaßt werden. Die Diskrepanz zwischen den 6,5% grün gefärbten Sporen und den 37% gekeimten Sporen bei  $p_H = 10,12$  mag ihre Erklärung darin finden, daß beim Auszählen der Färbungstypen stets sehr streng beurteilt wurde.

## c) Langfärbungen von 9 Std.

Die Keimungszeit der *Phycomyces*-Sporen wird normalerweise auf 8—12 Std festgelegt. Doch gilt diese Zeit nur, wenn sie sich im angefeuchteten organischen Milieu befinden. Liegen sie vollkommen submers in einer größeren Flüssigkeitsmenge, die frei von organischen Nährstoffen ist, so kann die Keimungszeit bis über 30 Std hinausgeschoben werden (vgl. BURGEFF, 1914, S. 260). Es ist dabei natürlich nicht ausgeschlossen, daß ein geringer Prozentsatz der Sporen doch zur Keimung schreitet, aber diese sind dann schon an ihrer Größe (durch die Wasseraufnahme) zu erkennen und wurden tunlichst von der Beobachtung ausgeschlossen. Die Methode der Keimungskontrolle war die gleiche wie vorher. Die Ergebnisse zeigen im großen und ganzen das oben geschilderte Bild. Um den Neutralpunkt herum sinkt mit dem starken Eindringen des Acridinorange auch die Keimfähigkeit. Besonders deutlich wird auch hier, daß die Färbungstypen III und IV als schädigende Nekroseerscheinungen anzusehen sind, wie wir sie schon beim Keimmycel kennenlernten.

## d) Langfärbungen von 28 Std.

Bei dieser langen Färbezeit wird deutlich, daß schon kurz vor dem Neutralpunkt die Keimkraft stärker nachläßt als vorher, doch ist das nicht allein auf die Wirkung des eindringenden Acridinoranges zurückzuführen, sondern auch auf die OH-Ionen, wie einige Kontrollversuche bestätigten. Eine Vacuolenfärbung war noch nie zu beobachten.

Weiterhin ist hier auffallend, daß nur noch bei  $p_H = 3,8$  68,5% ungefärbte Sporen vorhanden waren, und daß dann weiter zum alkalischen Bereich hin ungefärbte Sporen überhaupt nicht mehr auftraten. Diese Frage wird ihre Erklärung im folgenden Abschnitt finden.

## 2. Die quellende und keimende Spore.

Die Vitalfärbungsanalyse der quellenden und keimenden Spore erfolgt so, daß Sporen eines +- oder --Stammes in 3% Malzlösung eingequollen wurden. Von Zeit zu Zeit, etwa alle Viertelstunde, entnahm ich einen Tropfen der Sporenaufschwemmung und färbte ihn auf dem Objektträger mit Acridinorange 1:10000,  $p_H = 7,03$  im Überschuß an. Alle untersuchten Stämme und Geschlechter verhielten sich etwa gleich, so daß im folgenden nur ein Beispiel herausgegriffen wird. Aus den Ergebnissen des +-Stammes geht hervor, daß in den ersten 2 Std keinerlei Färbung auftritt. Die Sporen sind, da sie keine primäre Fluoreszenz zeigen, im UV-Licht unsichtbar. Erst nach 2 Std beginnt eine leichte Membranfärbung braunrot aufzuleuchten.

Wieder tritt uns die auffallende Erscheinung entgegen, daß sich ausgereifte *Phycomyces*-Sporen erst nach längerer Quellungszeit, in diesem Falle nach 2 Std., anfärben lassen. Zur selben Zeit bemerkt man, daß die Flüssigkeit der Sporenaufschwemmung eine olivgrüne Farbe angenommen hat. Es muß also ein Stoff aus der Spore in die sie umgebende Flüssigkeit diffundiert sein. Es handelt sich hierbei um das von SCHOPFER (1940) beschriebene Pigment. Ich fand, daß es stark fluoreszenzlöschend wirkt, denn die Beobachtung der Sporen im Hellfeld zeigt eine deutliche Membranfärbung, die nur durch das fluoreszenzlöschende Pigment solange nicht im Blaulicht deutlich werden kann, bis das Pigment herausgelöst ist.

Eine leichte, diffuse, grüne Plasmafärbung beginnt erst nach etwa  $3\frac{1}{2}$ —4 Std Quellungszeit. Um diese Zeit werden auch die ersten Kerne sichtbar, und zwar leuchten anfangs besonders stark die Caryosome als kleine Pünktchen gelb durch das grüne Plasma und später die Kerngrundsubstanz als schwach hellgrüner Hof.

Von 4—5 Std Quellungszeit an nimmt die Spore schnell an Größe zu. Als erstes bemerkt man, daß sich die Vacuole in ihr vergrößert und sich hin und wieder noch ein oder zwei (manchmal auch mehrere) Vacuolen neu hinzubilden. In diesen Vacuolen aber treten im alkalischen Bereich auch Farbspeicherungen auf. Von etwa  $p_H = 8,0$  ab waren erst vereinzelt rote Tröpfchen in den Vacuolen erkennbar, die sich nach dem alkalischen Bereich hin noch vergrößerten und vermehrten. Sie ergaben dasselbe Bild, wie die „Tröpfchenspeicherung“ bei Neutralrot (JOHANNES, 1939).

Gleich nach der ersten Vergrößerung und Vermehrung der Vacuolen treten auch die ersten Kernteilungen auf. Aus der durchschnittlich



4- bis 6-kernigen Spore werden Sporen von 18 und mehr Kernen. So zeigt uns die Abb. 3 eine stark gequollene Spore mit mehreren Vacuolen und Kernen. Das geschah etwa in der Zeit von 6—8 Std nach Beginn der Einquellung. Eine kurz vor der Keimung stehende Spore, die 7 Std eingequollen war und dann durch leichten Druck auf das Deckglas zum Platzen gebracht wurde, veranschaulicht Abb. 4. Deutlich sind die rot-fluoreszierende Sporenhaut und das herausgetretene Plasma zu erkennen. Eingebettet im Plasma liegen 13 Kerne, bei denen wir gut das helle, leuchtende Caryosom erkennen können. Da es sich hier um eine postvitale Färbung handelt, erscheinen die Kerne bedeutend

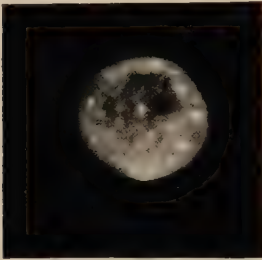


Abb. 3.



Abb. 4.

Abb. 3. Fluoreszenzaufnahme einer stark gequollenen *Phycomyces*-Spore. Gefärbt mit Acridinorange 1:50000. Erläuterungen im Text (Orig.).

Abb. 4. *Phycomyces*-Spore kurz vor der Keimung durch Druck auf das Deckglas zerplatzt. Gefärbt mit Acridinorange. Näheres siehe Text.

größer, als sie im normalen Zustand sind; wir haben hier den aufgequollenen Blaskern vor uns.

Nach etwa 7½ Std bilden sich dann die ersten Keimschläuche.

Fassen wir noch einmal kurz zusammen, so lassen sich folgende physiologische Veränderungen an der quellenden Spore in 3%iger Malzlösung feststellen:

- a) In den ersten 2 Std wird ein fluoreszenzlöschendes Pigment abgegeben, eine Speicherung des Acridinoranges in der Membran ist nur im Hellfeld zu erkennen.
- b) Nach 2½ Std tritt im UV-Licht sichtbare kupferrote Membranfärbung auf.
- c) Nach rund 3 Std erscheint diffuse grüne Plasmafärbung.
- d) Nach 4 Std werden die ersten Kerne sichtbar.
- e) Nach 5 Std vergrößern und vermehren sich die Vacuolen.
- f) Nach 6 Std gehen Kernteilungen vor sich.
- g) Nach 7½ Std beginnen die ersten Sporen zu keimen.

Es sei hier bemerkt, daß tote Sporen, die im übrigen sehr selten auftreten, sich immer sofort vollständig rot färben, vorausgesetzt natürlich, daß das Acridinorange im Überschuß vorliegt, wie das eingangs gefordert und durchgeführt wurde.

Die im Leitungswasser eingequollenen Sporen verhielten sich in der Folge der auftretenden physiologischen Zustände gleich wie die in 3%iger Malzlösung, doch war eine bedeutend höhere Quellungszeit nötig. So verschoben sich diese physiologischen Zustände um über 3 Std, d.h. Membranfärbung trat nach etwa  $5\frac{1}{2}$  Std ein, Plasmafärbung nach  $6\frac{1}{2}$  Std, Kernfärbung nach 7 Std, Vacuolenvergrößerung nach 8 Std, und Kernteilungen waren noch viel weiter hinausgeschoben.

### III. Der Sporangienträger.

Die Färbung der Sporangienträger wurde so vorgenommen, daß mit der Pinzette aus Malzagar-Kulturen die verschiedenen Altersstadien der Sporangienträger mit anhängendem Mycel entnommen wurden. Das läßt sich bei vorsichtiger Handhabung der Pinzette ohne Gefahr für die Lebensfähigkeit der Sporangienträger durchführen. Kontrollversuche bestätigten das und zeigten, daß es gleich war, ob man den Sporangienträger losgelöst auf dem Objektträger färbte oder im Verbands mit dem Mycel durch Übersichtung der ganzen Plattenkultur mit der gepufferten Farblösung behandelte. Bei der Beurteilung der Färbungen und ihrer Beschreibungen hatte sich herausgestellt, daß es erforderlich ist, die ganze Länge des Sporangienträgers in verschiedene Zonen aufzuteilen, was in folgender Weise geschah (Abb. 5):

Zone A: Basis der Sporangienträger einschließlich des unmittelbar anhängenden Mycelteiles der Traghyph.

Zone B: Die pigmentierte Region, die bei noch wachsenden Sporangienträgern etwa ein Drittel der Gesamtlänge einnimmt (später ist der ganze Träger pigmentiert).

Zone C: Eine Region von etwa gleicher Länge wie B anschließend an die pigmentierte Zone, in der höchstens noch basalwärts etwas Pigment zu finden ist.

Zone D: Eine kurze Strecke unterhalb der Spitze; sie entspricht etwa der Zone, in der nach OORT (1931) die zweite Membranschicht gebildet wird.

Zone E: Die eigentliche Spitze.

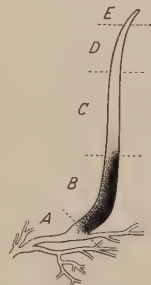


Abb. 5. *Phycomyces Blakesleanus*. Wachsender Sporangienträger (schematisch).

Die Färbungsergebnisse sind in einem Beispiel in Tab. 6 angegeben. Es handelt sich um Färbungen von 25 min bis zu einer Stunde. Die Färbezeit ist in der letzten Spalte verzeichnet. Die Kontrolle der Vitalität eines jeden untersuchten Sporangienträgers geschah so, daß er nach der Untersuchung auf kleine Malzagarplatten gelegt und am nächsten Tage daraufhin geprüft wurde, ob er weitergewachsen war. Die Ergebnisse dieser Kontrolle findet man in der vorletzten Spalte der Tab. 6.

Die Kurzfärbungen zeigen, daß auch im Sporangienträger ähnliche Färbungsverhältnisse vorliegen wie im Keimmycel. Etwa bis  $p_H = 3,0$  finden wir in allen Zonen außer der Zone B nur eine Imbibitionsfärbung

Tabelle 6. *Phycomyces Blakesleeanus*. Fluoreszenzanalyse der Färbung des Spor-

$p_H$	<i>Mycel</i>			<i>A</i>			<i>B</i>		
	M	Pl	V	M	Pl	V	M	Pl	V
1,95	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,55	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,98	<i>J</i> (+) graugrün	—	—	<i>J</i> (+) graugrün	—	—	—	—	—
3,18	+++ kupferrot	—	—	+ rötlich	—	—	—	—	—
4,48	+++ kupferrot	((+))? grünlich	—	++ rötlich	—	—	—	—	—
5,86	+++ kupferrot	—	—	+++ kupferrot	—	—	((+)) orange	—	—
6,30	+++ kupferrot	—	—	+++ kupferrot	—	—	((+)) orange	—	—
6,60	+++ kupferrot	(+) grün	—	+++ kupferrot	(+) grün	—	((+)) orange	—	—
7,01	+++ kupferrot	+ grün	—	+++ kupferrot	+ grün	—	((+)) orange	—	—
7,40	+ kupferrot	++ grün	( <i>EF</i> ) blau	+ kupferrot	++ grün	—	((+))? orange	?	—
8,35	(+) gelb- orange	++ grün	( <i>EF</i> ) blau	(+) gelb- orange	++ grün	<i>EF</i> blau	olivgrün		
10,48	durch ein Agarstück verdeckt								
11,25	—	+++ grün	( <i>EF</i> ) blau	—	+++ grün	<i>EF</i> blau	olivgrün		
11,41	—	+++ grün	<i>EF</i> blau	—	+++ grün	<i>EF</i> blau	olivgrün		

(Erläuterungen: *M* = Membran; *Pl* = Plasma; *V* = Vacuole; *A-C* = die verschiedenen Zonen des Sporangienträgers, vgl. Text; *J* = Inhibitionsfärbung; *EF* = Eigenfluoreszenz. Die Färbungsintensitäten sind durch +-Zeichen wiedergegeben: ((+)) kaum erkennbare Färbung, (+) Färbung sehr schwach, + Fär-



Sporangienträgers mit Acridinorange 1:50000. Färbungen nicht länger als 1 Std.

C			D			E			Wachstums- kontrolle	Färbungs- zeit in min
M	Pl	V	M	Pl	V	M	Pl	V		
—	—	—	—	—	—	geschädigt			(3)	32
—	—	—	—	—	—	J ((+)) graugrün	geschäd. rot	—	(2) × (1)	55 35
J ((+)) graugrün	—	—	J ((+)) graugrün	—	—	J ((+)) graugrün	—	—	(1)	50
+	—	—	+	—	—	(+) orange	—	—	(1)	25
gefleckt orange	—	—	leicht gefl. orange	—	—	+	—	—	(1)	30
++	—	—	+	—	—	homogen orangerot	—	EF blau	(1) × (1) ×	37 47
gefleckt rot	—	—	schw. gefl. orange	—	—	++ homogen kupferrot	—	—	(1)	40
++	—	—	leicht gefl. orange	—	—	++ kupferrot	—	—	(1)	45
gefleckt rot	—	—	leicht gefl. fast hom. orange	—	—	++ kupferrot	—	—	(1)	45
++	((+)) grün	—	leicht gefl. fast hom. orange	((+)) grün	—	++ kupferrot	+	grün	—	× 50
gefleckt rot	+	—	leicht gefl. fast hom. orange	+	—	++ kupferrot	++ grün	—	—	× 55
gefleckt rot	grün	—	leicht gefl. fast hom. orange	grün	—	+	+++ grün	—	(1) ×	30
+	++ grün	—	leicht gefl. fast hom. orange	++ grün	—	+	+++ grün	—	(1) ×	30
gefleckt rot	++ grün	—	leicht gefl. fast hom. orange	++ grün	—	+	+++ grün	—	(1) ×	30
((+)) gefleckt rotorange	++ grün	EF blau	+	+	—	geschädigt			(1) × ×	35 40
—	++ grün	EF blau	+	+	—	geschädigt			×	45
—	++ grün	EF blau	—	+++ grün	—	—	+++ grün	—	---	15
—	+++ grün	EF blau	—	+++ grün	—	—	+++ grün	—	---	66
—	+++ grün	EF blau	—	+++ grün	—	—	+++ grün	—	×	48

fung schwach, ++ Färbung gut sichtbar, +++ Färbung sehr stark und leuchtend. — Vorletzte Spalte: (1) oder (2) = Untersuchter Sporangienträger hat sich zu einem oder zwei neuen Trägern regeneriert, × = Untersuchter Sporangienträger ist zum Mycel ausgewachsen. --- nicht gewachsen.)

der Membran von sehr schwacher grau-grüner Fluoreszenz. Erst von  $p_H = 3,18$  ab werden die Ionen des Acridinoranges in der Membran gespeichert, die nun kupferrot aufleuchtet. Diese Membranfärbung hält sich in allen Zonen bis etwa  $p_H = 8,35$  außer der Zone E an der Spitze, bei der die Farbspeicherung bei  $p_H = 7,0$  schon bedeutend nachläßt. Interessant ist, daß die Zone B keinerlei Färbung der Membranen im Fluoreszenzlicht erkennen läßt. Die Membranfärbung bricht im Gegenteil ganz scharf ab (Abb. 6). Sie ist aber im Hellfeld sichtbar. Auch die

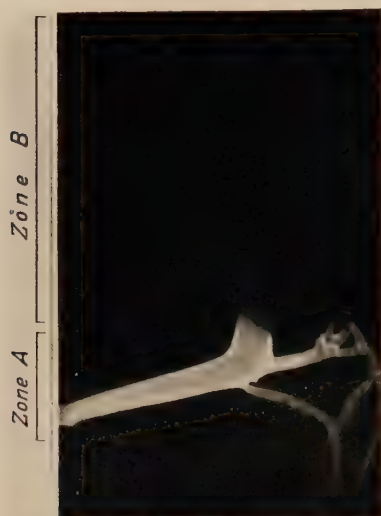


Abb. 6. Fluoreszenzaufnahme der Basis des Sporangienträgers mit anhängendem Mycel mit kupferroter Membranfärbung, die zur Zone B hin durch ein Pigment gelöscht wird.

Membranfärbung der Zonen C und D unterscheidet sich wesentlich von der Färbung der Zonen A und E und der sonstigen Mycelteile. Während wir bei den letzteren ein gleichmäßiges homogen kupferrotes Aufleuchten wahrnehmen, zeigen die Zonen C und D eine fleckige Färbung, d. h. im optischen Schnitt betrachtet sehen die Membranen wie gestrichelt aus. Man sieht eine schollenförmige, fleckige Farbspeicherung. Meistens sind diese Farbflecken zu größeren Arealen vereinigt oder besonders in Zone C ringförmig angeordnet. Wir finden hier eine ähnliche Färbung, wie sie BORRIS (1934) für *Coprinus*-Arten feststellte.

Plasma- und Kernfärbung treten etwa bei  $p_H = 6,6$  auf und bleiben

bis weit in den alkalischen Bereich erhalten. Wohl färbt sich das Plasma der Spitzenzone E oftmals schon im stark sauren Bereich bis  $p_H = 3,0$ , doch ist dann die äußerste Spitze kupferrot oder orangerot, ein Zeichen dafür, daß das Plasma sehr stark geschädigt ist und nur deshalb keine vollständig kupferrote Färbung angenommen hat, weil durch die Kurzfärbungen nicht genügend Farbstoff eingedrungen ist. Auch die Sistierung der Plasmaströmung und das Auftreten von Plasmoptysen zeichnen den geschädigten Zustand der Sporangienträgerspitze.

Eine Vacuolenfärbung habe ich hierbei nicht erhalten. Immer leuchtete die Vacuole blau in ihrer Eigenfluoreszenz durch das grüne Plasma, ihre scharf abgerundeten, deutlichen Tonoplasten deuten auf Vacuolenkontraktion hin und lassen vermuten, daß doch schon Farbstoff aufgenommen wurde.

Über Langfärbungen kann zusammenfassend gesagt werden, daß die Färbungen bis zu 2 Std und auch die bis zu 5 Std sich in den Zonen A und E gleich verhalten wie die Kurzfärbungen. In der Zone C bleibt auch bei den längsten Färbungen diese gefleckte, bzw. ringförmige Speicherung erhalten. Nur in der Zone D gleicht sie sich aus zur homogenen Membranfärbung.

Die Zone B zeigt im Hellfeld anfangs eine nicht gleichmäßige, später gleichbleibende, starke, orangefarbige Membranfärbung. Trotzdem ist bei denselben Objekten im Fluoreszenzlicht keine Speicherung des Acridinoranges zu erkennen. Es handelt sich bei dieser Zone um dieselbe fluoreszenzlöschende Wirkung des Pigmentes, die schon bei der Spore besprochen wurde; denn auch hier läßt sich, allerdings erst nach Tagen, ein olivgrüner Farbstoff herauslösen, und dann leuchtet auch diese Zone in schwacher Membranfärbung auf.

Auf eine interessante Erscheinung soll noch hingewiesen werden. Im Bereich von  $p_H = 6-7$  wurden oft systrophische Ballungen des Protoplasmas gesehen. Es handelt sich hierbei um ähnliche Quellungserscheinungen, wie sie BALBACH (1937) und BLAESS (1942) am Gametenapparat von *Phycomyces* beschrieben haben (siehe auch KÜSTER 1939).

Auf Grund der vielen Färbungen kann mit ziemlicher Genauigkeit gesagt werden, daß der IEP (isoelektrischer Punkt) der ausgewachsenen Sporangienträgermembranen etwa bei  $p_H = 3,18$  liegen muß, denn unterhalb dieses Punktes habe ich nie eine kupferrote, oberhalb davon stets eine starke Membranfärbung beobachtet, um  $p_H = 3,18$  herum eine orangerote Membranfärbung von sehr wechselnder Intensität.

#### IV. Die Kopulationsorgane.

Die Färbung der Kopulationsorgane erforderte eine etwas modifizierte Methodik. Die vorn erwähnten Schwierigkeiten, ganze Kulturen auf Agar anzufärben, mußten hier auf ein Mindestmaß herabgesetzt werden. Es wurde so vorgegangen: Am geeignetsten für die Kultur erwiesen sich Petrischalen, deren Boden nicht ganz eben war, sondern leicht nach oben gewölbt. Goß man hierin den Agar in dünner Schicht aus, so war er am Rande dick genug, um kein „Hungermycel“ zu veranlassen, aber in der Mitte, wo die Kopulationszone entstand, war er sehr dünn, so daß seine Fluoreszenz nach der Anfärbung nicht erheblich störend wirkte. Oder es wurde so vorgegangen, daß dünn ausgegossene Agarplatten durch Auflegen dickerer Agarestreifen auf den Seiten der Impfstellen verstärkt wurden und so für den nötigen Nährstoffnachschub gesorgt war.

Kopulierende Mycelien im Alter von durchschnittlich 4–8 Tagen wurden mit einer Acridinorangefärbung 1:50000 bestimmter  $C_H$  überschichtet. Nach der gewünschten Färbezeit (im Durchschnitt nach 1–5 min) wurde die Farbe abgegossen und durch farblosen Puffer derselben  $C_H$  ersetzt. Mit schwächeren Objektiven konnte nun direkt untersucht werden. Bei starken Vergrößerungen dagegen goß ich den farblosen Puffer bis auf einen geringen Rest ab und legte ein dünnes Deckglas auf, das auch die Anwendung von Ölimmersionen gestattete.



Es wurden untersucht: 1. alle Altersstadien der Kopulation, 2. diese Altersstadien bei verschiedenster  $C_H$  des Außenmediums. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen seien im folgenden zusammenfassend dargestellt.

a) Im Bereich unter  $p_H = 3,0$  tritt keine deutliche Vitalfärbung auf. Eine leichte Imbibitionsfärbung der Suspensorenmembranen ist zu erkennen. Nur bei den älteren Stadien, bei denen schon die Dornen ausgebildet sind, treten an diesen sehr viele Plasmoptysen auf. Das ausgetretene Plasma färbt sich homogen rot. Weiter zum Inneren der Dornen hin kann es oft schwach grünlich bleiben oder gar alle Übergänge über Gelb und Orange aufweisen. Es handelt sich hierbei aber doch um bereits abgestorbenes Plasma, wie seine Konfiguration zeigt, das sich aber nicht voll ausfärben konnte, weil die Farbkonzentration zu schwach ist, bzw. nur noch farbloser Puffer vorhanden ist.

b) Über  $p_H = 3,0$  bis zum Neutralpunkt hin speichern alle Kopulationsstadien die Ionen des Acridinoranges in den Membranen, und diese leuchten gleißend kupferrot auf. Besonders eindrucksvoll ist das um  $p_H = 5-6$ . Von  $p_H = 6,0$  ab ist nicht mehr eine gleichmäßige Membranfärbung bei beiden Geschlechtern zu erkennen, sondern der (+)-Stamm verliert seine Membranfärbung schneller als der (—)-Stamm. So kommt es, daß wir um  $p_H = 6,9-7,1$  Suspensoren verschiedenen Alters finden, die leuchtende Membranfärbung mit höchstens ganz schwacher Plasmafärbung im (—)-Stamm aufweisen und deren (+)-Stamm kaum noch Membranfärbung erkennen läßt, bei dem aber dafür Plasma und Kerne in sattem Grün leuchten. Es ist das eine Parallele zu den Befunden mit Neutralrot (JOHANNES, 1939).

c) Von  $p_H = 7,3$  bis zum stark alkalischen Bereich hin tritt in den Kopulationsorganen aller Entwicklungsstadien eine eindeutige, diffuse, grüne Plasma- und Kernfärbung auf. Wegen der Dicke des Plasmawandbelages in den Suspensoren und Gametangien ließen sich leider feinste cytologische Untersuchungen noch nicht vornehmen. Mit einer Verfeinerung der Methodik werden auch Kernvorgänge in den Gametangien einer Lebenduntersuchung zugänglich werden. Die Vacuolen färbten sich auch im stark alkalischen Bereich nicht, zumindest wurde keine Färbung beobachtet. Die starke Giftigkeit des Farbstoffes aber in dem Bereich läßt darauf schließen, daß doch mehr (zuviel) Farbstoff über die Vacuole in das Plasma eingedrungen ist, denn es gelang im alkalischen Bereich selten, die Gametangien lebend zu erhalten.

## V. Die Zygote.

Die Vitalfärbung der Zygote bereitet noch größere Schwierigkeiten, so daß die vorliegenden Ergebnisse nur als erste tastende Vorversuche zu werten sind. Bekanntlich umhüllt sich die reifende Zygote mit fünf Schichten, von denen man die beiden äußeren unter dem Namen Exospor und die drei inneren unter dem

Namen Endospor zusammenfaßt. Das Exospor enthält das vorn mehrmals erwähnte fluoreszenzlöschende Pigment in größerer Menge. Außerdem erlaubt sie durch ihre Stärke keinerlei Einblick in die Zygote in vitro. Unter dem Präpariermikroskop läßt sie sich bei einiger Geschicklichkeit und Übung mit zwei Nadeln vom Endospor lösen. Man kann die Zygote „schälen“. Die drei weiteren Schichten, das Endospor, lassen einen Einblick in das Innere zu. Im Hellfeld sieht man meist zentral einen großen Öltropfen liegen. Irgendwelche näheren Einzelheiten über Plasmastruktur usw. waren nicht zu erkennen.

Zuerst galt es, die Primärfluoreszenz der Zygote genauestens festzulegen. Im UV-Licht mit Euphossperre zeigt sich, daß das Endospor selbst keine Eigenfluoreszenz besitzt. Das Innere der Zygote leuchtet homogen blau-grau-grün. Durch diese Eigenfluoreszenz des Plasmas sieht man den Öltropfen in satterem Blau aufleuchten.

Die geschälten Zygoten wurden mit Acridinorange-Lösungen 1:50000 verschiedener  $p_H$ -Werte gefärbt und im UV- bzw. Blau-Licht untersucht. Es ergab sich:

Bei vorsichtiger Anfärbung trat unter  $p_H = 3,1$  keine deutliche Färbung auf. Das Endospor ist nur leicht imbibiert und erscheint als schwach grüne Linie. Die Oberfläche des Öltropfens, also die Grenzschicht zwischen Öl und Plasma, scheint leicht orange aufzuleuchten. Es ist dabei schwer zu unterscheiden, ob es sich nicht trotz schonendster Behandlung um eine Schädigung handelt, die durch die hohe Wasserstoffionenkonzentration hervorgerufen wurde. Bei  $p_H = 6,0$  tritt eine gelblich-grüne Plasmafärbung auf, durch die der Öltropfen blau hindurchschimmert. Gefärbte Kerne habe ich nicht beobachtet. Auch eine Speicherung im Endospor konnte ich nie erkennen. Weiter zum alkalischen Bereich hin bleibt die gelblich-grüne Plasmafärbung bestehen, jetzt leuchtet aber die Ölkugel in sattem Blaugrün hindurch.

Bei Übertragung der im alkalischen Bereich gefärbten Zygoten in sauren Puffer konnte dem Öltropfen das Acridinorange wieder restlos entzogen werden. Es bildeten sich dann vielfach auf der Oberfläche der Ölkugel einige dunkle bräunliche Linien (Farblackbildung?), sonst blieb der Inhalt homogen grün gefärbt.

Eine Vitalitätskontrolle der Färbung wurde vorerst nicht vorgenommen, doch wurden die Zygoten von der Betrachtung ausgeschieden, bei denen von vornherein zu erkennen war, daß das Plasma stärkere Schädigungen davontrug.

### Besprechung.

Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit Acridinorange und der früher (JOHANNES 1939, 1941) gewonnenen Resultate mit Neutralrot und anderen Farbstoffen an *Phycomyces*, *Basidiobolus* und *Saprolegnia* mit den Ergebnissen anderer Autoren an höheren Pflanzen läßt wichtige Schlüsse auf die Aufnahme basischer Farbstoffe durch die Zelle zu.

1. Der Speicherungsmodus wird vom Dissoziationsgrad des Farbstoffes beeinflusst, der wiederum von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt. Es ist also entscheidend, bei welchen  $p_H$ -Werten der Farbstoff nur als Ion oder Molekül oder in einer Mischung beider vorliegt und der Zelle dargeboten wird.

Vergleiche zwischen dem Dissoziationsgrad des Farbstoffes, also zwischen Farblösungen bei verschiedenen  $p_H$ -Werten und dem Färbungsbild zeigen, daß sich grundsätzlich drei Möglichkeiten herauschälen lassen:

a) Unterhalb des isoelektrischen Punktes (IEP) der meisten Cellulosemembranen, der etwa zwischen  $p_H = 3$  und  $3,5$  liegt, tritt mit basischen Farben keine Färbung ein. Die Membranen sind positiv geladen und nicht in der Lage, die ebenfalls positiven Ionen (Kationen) des Farbstoffes in irgendeiner Form festzuhalten. Durch die im Gegenteil eintretende Abstoßung der gleichnamigen Ladungen wirken die Membranen als hermetische Sperren, und auch das Innere der Zelle kann basische Farben unterhalb des IEPs der Zellmembranen nicht aufnehmen.

b) Oberhalb des IEPs der Membranen aber adsorbieren sie mit großer Kraft die Kationen auf Grund ihrer negativen Ladung. Sie färben sich stark an, und wir erwarten, daß sie sich bis zu dem Bereich anfärben, in dem keine Kationen in der Farblösung vorhanden sind, im alkalischen Bereich nach dem Umschlagspunkt des Farbstoffes.

c) Mit steigender Alkalinität der Farblösung des Außenmediums verschiebt sich das Verhältnis Ionen/Moleküle zugunsten der Moleküle. Die Membranfärbung läßt entsprechend nach, und die Vacuolen speichern den Farbstoff. Dabei entsteht Vacuolenkontraktion, die um so härter zum Ausdruck kommt, je alkalischer die Farblösung ist. Diesem Modus folgen die von mir (1939) untersuchten Hellfarbstoffe. Auch das Acridinorange fügt sich diesem Schema ein. Mit dem Nachlassen der Membranfärbung beginnt eine Speicherung im Vacuum, die sich anfangs nur durch Vacuolenkontraktion kundtut, später leuchten die stark kontrahierten Vacuolen gleißend kupferrot auf, entmischen sich aber wieder sehr schnell und rufen in dem schon gequollenen Plasma irreversible Schädigungen hervor.

Es läßt sich aber bei den basischen Farbstoffen ein „Umschlagsbereich“ feststellen, d. i. ein  $p_H$ -Bereich der Farblösung, in dem die Membranen aufhören, die Kationen zu adsorbieren, und in dem die Vacuole anfängt, die Moleküle der Farbbase zu speichern. Dieser „Umschlagsbereich“ ist in erster Linie von den Dissoziationseigenschaften des Farbstoffes abhängig. So liegt er für Neutralrot bei jungen Hyphen bei  $p_H = 6,9-7,2$ , für Methylenblau bei denselben jungen Hyphen aber bei  $p_H = 9,8-10,3$ , weil erst in diesem stark alkalischen Bereich die Dissoziation des Farbstoffes nachläßt.



2. Neben der  $C_H$  des Außenmediums ist auch der augenblickliche physiologische Zustand der zu färbenden Zellen maßgebend, denn der „Umschlagsbereich“ Zellmembran/Vacuole ist nicht für alle Zellen gleich. So haben alte Mycelstränge im stark alkalischen Bereich ihren „Umschlagsbereich“ und je jünger die Mycelpartien werden, desto weiter im sauren Bereich vollzieht sich der Umschlag. Dasselbe fand STRUGGER (1937) z. B. auch an den Wurzeln von *Triticum* oder bei „ruhenden“ und „austreibenden“ Zwiebeln, von denen letztere schon zwischen  $p_H = 3$  bis 4 Vacuolenfärbung aufweisen konnten. Zugleich wurde deutlich, daß die Vacuole in einem ganz anderen Farbton das Neutralrot aufnahm. Sie selbst schien saurer geworden zu sein, denn „ruhende“ Zwiebeln erhalten eine orange-rote, und „treibende“ Zwiebeln eine bläulich-rote Vacuolenfärbung. Derselbe Modus läßt sich an Blättern von *Helodea canadensis* beobachten, wo ich (noch unveröffentlicht) orange-rote Vacuolenfärbung mit starker Vacuolenkontraktion in alten Zellen der Dauerzone, also zur Spitze des Blattes hin, im stärker alkalischen Bereich erhielt, und wo ich in den jüngeren Blattpartien der Streckungszone blau-rote Vacuolenfärbung mit geringer Vacuolenkontraktion bei mehr sauren  $p_H$ -Werten der Farblösung vorfand. Das gleiche ist bei *Phycomyces* mit Neutralrot zu erkennen, zwar etwas weniger deutlich in den Übergängen, denn die Beurteilung der kleinen Farbtröpfchen ist ungleich schwieriger als der Vergleich großer Farbflächen bei *Allium* oder *Helodea*; doch steht der wesentlich kräftigere rote Farbton der Tröpfchen junger Hyphenspitzen dem mehr braun-roten Farbton der Tröpfchen oder der orange-roten diffusen Färbung des Vacuoms alter Hyphen gegenüber. Geht mit zunehmendem Alter einer Zelle eine Alkalinisierung des Vacuoms vor sich, was auch DRAWERT (1937) annimmt, so verschiebt sich auch der Umschlagsbereich Membran/Vacuole nach der alkalischen Seite hin. Kann man den Farbton der mit Neutralrot (und auch Methylenblau) gefärbten Vacuole für ein gültiges Maß ihres  $p_H$ -Wertes ansehen, indem man ihn mit gepufferten Farblösungen vergleicht, so liegt der Schluß nahe, daß der Farbstoff zu den Orten strebt, die am sauersten sind, an denen er am stärksten dissoziieren kann. Er verläßt dabei sogar die Membranen in Bereichen, in denen stärkste Membranfärbung zu erwarten wäre und wandert dann in die Vacuolen, wenn diese saurer als das Außenmedium sind. Das trifft jedenfalls für alle die basischen Farbstoffe zu, die ich selbst untersuchen konnte und für die anderen, von denen ich entsprechende Ergebnisse aus den Arbeiten von STRUGGER und DRAWERT ablesen konnte. Über das Verhalten der sauren Farbstoffe soll in einem späteren Beitrag berichtet werden.

3. Der im Vorstehenden als generell erkannte Färbungsmodus: Membranfärbung/Vacuolenfärbung scheint vom basischen Farbstoff Acridinorange durchbrochen zu werden. Zwischen die Membranfärbung

einerseits und die Vacuolenfärbung andererseits schiebt sich eine Plasma-Kernfärbung ein. Dasselbe ist auch für Neutralrot von STRUGGER (1940) nachgewiesen. Sie ist im Hellfeld nicht mehr sichtbar, bis auf die Plasma-Kernfärbung mit Neutralrot bei *Basidiobolus ranarum* (JOHANNES, 1939). Es gilt nun zu klären, wie diese Färbung zustande kommt und welcher Mechanismus ihr zugrunde liegt; die theoretischen Möglichkeiten sollen erörtert werden. Auffallend ist, daß bis auf den Fall bei *Basidiobolus ranarum* diese Plasma-Kernfärbung nur im UV-Licht sichtbar ist. Sie ist nur mit einer Methode nachweisbar, die uns gestattet, recht schwache Verdünnungen der Fluorochrome noch zu erkennen.

a) Vergleichen wir Farbverdünnungsreihen in gleicher Schichtdicke wie die Hyphen des *Phycomyces* mit den gefärbten Hyphen, so kann man bei Acridinorange auf eine Konzentration im Plasma von 1:50000 bis 1:100000 schließen. STRUGGER (1947, S. 268) gibt nach Untersuchungen von KÖLBEL (1947) eine Konzentration von 1:5000—1:50000 an. Da die Pilzmycelien mit Acridinorange-Lösungen der Konzentration 1:10000 bis 1:50000 angefärbt wurden, kann man wohl kaum von einer Speicherung des Farbstoffes im Plasma-Kernkomplex sprechen, denn bei einer Speicherung setzt man doch eine mehr oder weniger starke Anreicherung der Farbkomponenten voraus. Es liegt hier der Schluß nahe, daß nur eine Durchtränkung, eine Imbibition, des Plasmas vorliegt. Sie entspricht etwa der verstärkten Imbibitionsfärbung der Membranen unterhalb ihres IEP. Und weil die Färbung in dem  $p_H$ -Bereich auftritt, in dem sich der Farbstoff auf der Wanderung vom Außenmedium zur Vacuole befindet, wäre es zu denken, daß er eben gerade die Poren des Plasmas anfüllt, denn seine Konzentration liegt unter der dargebotenen. Ein Eindringen des Acridinoranges auf Grund einer besonderen „selektiven Permeabilität“ der Plasmahäute braucht hierbei nicht gefordert zu werden. Auch die absolute Unschädlichkeit dieser Plasma-Kernfärbung deutet darauf hin, daß keine lebenswichtigen Komponenten des Plasmas mit gespeicherten Farbstoffen „belastet“ werden.

b) Tritt eine stärkere gelbgrüne Plasmafärbung ein, macht sich also ein „Konzentrationseffekt“ deutlich, so muß man annehmen, daß sich die Kationen des Acridinorange in den hydrophilen Gruppen einlagern, denn die Farbbase des Acridinorange fluoresciert nicht, sondern nur die wäßrige Lösung der Kationen, und auch nur der kommt der „Konzentrationseffekt“ zu. Dann würden aber wahrscheinlich mehr Carboxylgruppen des Polypeptidgerüsts mit Farbkationen abgesättigt, als für einen normalen Ablauf der Lebensvorgänge erträglich ist. Es würden dann Erscheinungen eintreten, wie sie beim geschädigten und absterbenden Protoplasten sofort deutlich werden (vgl. den Abschnitt über die Nekrosen).

Die scheinbar aus dem Rahmen fallende Neutralrotfärbung des Plasma-Kernkomplexes bei *Basidiobolus ranarum* ordnet sich diesem letzten Färbungsmodus mit Acridinorange ein, weil hier keine unschädliche Färbung vorliegt, sondern stets die Plasmaströmung vollständig sistiert ist und die sehr starke Vacuolisation des Plasmas auf starke, wenn auch noch reversible Schäden hindeutet. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen dieser Zellen habe ich leider seinerzeit nicht vorgenommen. Der kräftig rote Farbton dieser Färbung im Hellfeld ist auch nur den sauren Neutralrot-Lösungen eigen. Es ist also anzunehmen, daß Kationen des Farbstoffes in erhöhtem Maße in das Plasma eindringen und lebenswichtige Carboxylgruppen des Polypeptidgerüsts „beschwerten“ und diese für die Lebensprozesse unwirksam machten. Das ist um so wahrscheinlicher, als bei *Basidiobolus* die Membranen nicht negativ geladen sind und keine Kationen adsorbierten, also nicht als elektrostatische Sperre dienen konnten. Dasselbe Bild erhält man auch mit Methylenblau, das aber insofern ungiftiger wirkt, als es bald vom Plasma und auch vom Kern reduziert wird und seine Leukobase auch in höherer Konzentration geringere Schäden hervorruft.

c) Anders liegen die Verhältnisse bei der unschädlichen Plasma- Kernfärbung mit Neutralrot, die nur im UV-Licht erkannt werden kann. Hier sind es die Moleküle der Farbbase, die in der lipophilen Phase des Modellversuches eine gelbgrüne Fluoreszenz aufweisen, die auch das Plasma im UV-Licht zeigt (STRUGGER, 1940, S. 606). Wir müssen also annehmen, daß es hier die neutralen Lipide des Plasmas sind, in denen sich geringe Mengen des Farbstoffes lösen.

Fassen wir noch einmal die Erkenntnisse über die Plasma-Kernfärbungen mit den basischen Fluorochromen Acridinorange und Neutralrot zusammen, so ergibt sich, daß es zur Klärung dieser Färbungen nicht nötig ist, eine Speicherung (= Anreicherung) vorauszusetzen, denn beide Farbstoffe würden dann trotz ihres sonstigen übereinstimmenden Verhaltens dazu zwingen, einmal eine Kationenadsorption an hydrophilen Carboxylgruppen und das andere Mal eine Lösung an hydrophoben Lipoiden vorauszusetzen. Ich halte es auf Grund der Erfahrungen an *Phycomyces* zwar auch für möglich, daß sich das Acridinorange in sehr geringen Mengen als Kation dem Eiweißgerüst „organisch“ einfügen läßt, möchte aber die Bedenken bestehen lassen, daß jede Speicherung im Sinne einer Anreicherung durch Absättigung lebensnotwendiger Reaktionsgruppen zu einer Schädigung des Protoplasten führt. Seltsamerweise steigert sich die Empfindlichkeit des Plasmas gegen eindringende basische Farbstoffe mit steigender Alkalinität des Außenmediums, also mit der Abnahme der Ionen<sup>1</sup>, und wir erhalten

<sup>1</sup> Über die Giftigkeit der basischen Farbstoffe werde ich im nächsten Beitrag berichten.



noch eine Plasma-Kernfärbung in  $p_H$ -Bereichen, wo gar keine Kationen im Außenmedium mehr vorhanden sind. Die Beobachtung der Nekroseerscheinungen in diesem Bereich deutet auch darauf hin, daß nicht das Plasma primär den Farbstoff aus dem Außenmedium aufnimmt, sondern die schnell reagierende Komponente der Zelle ist die Vacuole, und sie gibt nun erst den Farbstoff, der teilweise in ihren Fettsäuren gelöst, also dissoziiert ist, an das Plasma ab. Es wäre auch zu unverständlich, wenn das hochkomplizierte Micellargerüst des Plasmas auf jeden Anreiz von außen schlagartig reagieren würde; die Vorstellung, die Vacuole als „ausgleichenden Puffer“ anzusehen, würde uns zwingen, ihrer Physiologie mehr Beachtung zu schenken<sup>1</sup>.

### Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. *Phycomyces Blakesleeanus* Burgeff wird in allen seinen Entwicklungsstadien mit Acridinorange (Bayer) vital gefärbt. Die Färbungsbilder werden einer genauen Analyse unterworfen.

2. Die von STRUGGER an höheren Pflanzen, Bakterien und Hefen erprobte Methodik der Unterscheidung lebenden und toten Plasmas läßt sich auch an diesem Pilz unter bestimmten Bedingungen durchführen.

3. Der Längsgradient der Färbbarkeit im polyenergiden Mycel des *Phycomyces*, der sich mit Neutralrot (JOHANNES, 1939) aufzeigen ließ, wird auch bei der Färbung mit Acridinorange deutlich.

4. Abhängig vom  $p_H$ -Wert des Außenmediums lassen sich die Membranen, das Plasma und die Kerne und die Vacuolen anfärben.

5. Erstmals werden damit die Kerne des *Phycomyces* lebend gefärbt und können so eingehenderen cytologischen Untersuchungen zugänglich gemacht werden. Ihre Struktur als Protistenkerne im Sinne BELARS wird erkannt. Charakteristisch für den *Phycomyces*-Kern ist die exzentrische Lage seines Caryosoms.

6. Nekroseerscheinungen an mit Acridinorange gefärbten Mycelien, die durch Bestrahlung mit UV- oder Blau-Licht entstehen, werden beschrieben.

7. Ungequollene Sporen des *Phycomyces* lassen sich in saurer Farblösung nicht anfärben. Eine Membranfärbung wird im UV-Licht erst sichtbar, wenn sich ein fluoreszenzlöschendes Pigment aus der Membran herausgelöst hat.

8. Langfärbungen an Sporen ergaben mit dem Eindringen des Acridinorange mit abnehmender H-Ionenkonzentration ein parallel verlaufendes Abnehmen der Keimfähigkeit. Sporen, deren Plasma nicht mehr grün, sondern gelb oder orange fluoresciert, keimen nicht mehr aus.

<sup>1</sup> Während der Drucklegung dieser Arbeit erhielt ich noch die Arbeit von DRAWERT (Ztschr. f. Naturf. 3b, 1948, 11—120), in der er auf Grund größeren Materials zum selben Schluß gelangt.

9. Mit Hilfe der Acridinorange-Färbung werden an quellenden und keimenden Sporen folgende physiologische Veränderungen erkannt:

- a) Herauslösen eines fluorescenzlöschenden Pigmentes,
- b) Auftreten einer Membranfärbung,
- c) Auftreten diffuser Plasmafärbung,
- d) Auftreten einer Kernfärbung,
- e) Vergrößerung und Vermehrung der Vacuolen durch Wasseraufnahme,
- f) Auftreten der Kernteilungen,
- g) Beginn der Keimung.

Diese Vorgänge laufen immer wiederkehrend in etwa 8 Std ab, wenn die Sporen in 3%iger Malzlösung gehalten werden. In reinem Leitungswasser wird die Keimung wesentlich verzögert, und somit rücken auch die einzelnen Stadien weiter auseinander, bleiben aber in derselben Folge bestehen.

10. Die Färbung des wachsenden Sporangienträgers läßt auch hier den Längsgradienten erkennen. Das fluorescenzlöschende Pigment verhindert nahe der Basis ein Sichtbarwerden der Färbung im UV-Licht. In einer mittleren Zone entsteht eine ringförmige Farbspeicherung, für die noch keine Erklärung gegeben werden kann.

11. Der mit Neutralrot erkannte Färbungsunterschied der beiden isogamen Geschlechter bei der Kopulation (JOHANNES, 1939) ist auch mit Acridinorange möglich und wirkt noch eindrucksvoller, da sich hier kupferrote Membranfärbung einerseits und grüne Plasma- und Kernfärbung andererseits gegenüberstehen, während beim Neutralrot nur ein Mehr oder Weniger der rotbraunen Membranfärbung beobachtet werden konnte. Die Lage des Umschlagspunktes ( $p_H = 6,9-7,1$ ) ist aber bei beiden Farben dieselbe. Auch der Umschlagsbereich Membran—Zellinneres ist wie bei der Neutralrotfärbung beim + -Stamm weiter zum sauren Bereich hin verschoben als der des — Stammes.

12. Die Vitalfärbung der Zygote wurde in Vorversuchen studiert. Nach dem Abschälen des Exospors läßt sich eine Plasmafärbung und eine Färbung des Öltropfens in Abhängigkeit vom  $p_H$ -Wert erzielen. Auch Umlagerungen des Farbstoffes durch farblose Puffergemische sind möglich. Eine Membranfärbung des Endospors wurde nicht erreicht.

13. Die mit dem basischen Farbstoff Acridinorange gewonnenen Ergebnisse an *Phycomyces* werden mit den früher an Pilzmycelien gewonnenen Ergebnissen (1939, 1941) verglichen und es wird der Versuch unternommen, eine Theorie der Stoffaufnahme für die basischen Farbstoffe aufzustellen. Es wird erkannt, daß der Speicherungsmodus abhängt:

- a) vom Dissoziationsgrad des Farbstoffes und damit von der Wasserstoffionenkonzentration des Außenmediums,
- b) von dem Verhältnis: Wasserstoffionenkonzentration der Vacuole und Wasserstoffionenkonzentration des Außenmediums.

14. Auf Grund der Färbungen junger und älterer Mycelteile und auf Grund von Färbungen an *Helodea* und *Allium* wird angenommen, daß die basischen Farbstoffe nach den Orten streben, an denen sie am besten dissoziieren können, also zu Orten höchster H-Ionenkonzentration.

15. Die unschädliche Plasma-Kernfärbung mit Acridinorange wird als „Imbibitionsfärbung“ erkannt. Jede Speicherung im engeren Sinne einer Anreicherung führt zu beachtlichen Schäden oder zum Zelltod.

16. Eine Diskussion der bisher bekanntgewordenen Ergebnisse über die Aufnahme von Neutralrot und Acridinorange führt zu dem Schluß, daß nicht das Plasma, sondern die Vacuole in erster Linie auf äußere Faktorenänderungen reagiert.

### Literatur.

BALBACH, H.: Über Quellung und Systrophe des Protoplasmas (Untersuchungen am Gametenapparat von *Phycomyces*). *Protoplasma* **28**, 86 (1937). — BELAR, K.: Der Formwechsel des Protistenkerns, Berlin (1926). — BLAESS, H.: Bewegungen des systrophischen und ultravacuolären Protoplasmas. *Protoplasma* **36**, 177 (1942). — BÜNNING, E.: Über die Farbstoff- und Nitrataufnahme bei *Aspergillus niger*. *Flora* **31**, 87 (1936). — BURGEFF, H.: Untersuchungen über Variabilität, Sexualität und Erbllichkeit bei *Phycomyces nitens* KUNZE. I. *Flora* **7**, 259 (1914).

COLLANDER, R., u. E. VIRTANEN: Die Undurchlässigkeit pflanzlicher Protoplasten für Sulfosäurefarbstoffe. *Protoplasma* **31**, 499 (1938).

DRAWERT, H.: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration, *Flora*, **32**, 91 (1937).

GROHROCK, E.: Über die Umhütung isolierter Protoplaststücke. Untersuchungen an *Saprolegnien*. *Planta* **23**, 313 (1935). — GUILLIERMOND, A.: Nouvelles recherches sur les corpuscules metachromatiques des champignons. *C. R. Soc. Biol.* **79**, 1091 (1916); Observations cytologiques sur le cytoplasma d'un *Saprolegnia*. *La cellule* **30**, 357 (1920); Nouvelles observations cytologiques sur les *Saprolegniacées*. *La Cellule* **32**, 429 (1922); Sur la coloration vitale des chondriosomes. *C. R. Soc. Biol.* **89**, 527 (1923); Sur l'action du rouge neutre sur les cellules végétales et sur la coloration vitale du vacuome. *Bull. hist. Phys. et Path.* **4** (1927); Nouvelles observations sur la coloration vitale par le rouge neutre dans les cellules végétales. *C. R. Acad. Sc. Paris* **188**, 813 (1929); Sur la formation des zoosporanges et la germination des spores chez un *Saprolegnia* en cultures sur milieux nutritifs additionnés de rouge neutre. *C. R. Acad. Sci. Paris* **190**, 384 (1930). — GUILLIERMOND, A., et R. GAUTHERET: Sur les conditions dans lesquelles se produit la coloration vitale des vacuoles par le rouge neutre. *C. R. Acad. Sci. Paris* **204**, 1377 (1937); Sur la propriété des cellules végétales d'exécuter le rouge neutre après l'avoir accumulé dans leurs vacuoles. *C. R. Acad. Sci. Paris* **204**, 1520 (1937).

JABLOKOWA, V. A.: Response of the mycelium of *Ustilago tritici* in wheat grain to ultra-violet rays as dependent upon its condition. *C. R. (Doklady) Acad. Sci. USSR, NS.* **23** (1933) (russisch). — JOHANNES, H.: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien I. *Flora* **34**, 58 (1939); Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien II. Die Interbanz der Färbungen mit Rhodaminen. *Protoplasma* **36**, 181 (1941).

KÜSTER, E.: Über Plasmafropfungen. G. Fischer, Jena (1939); Über die vitale Aufnahme saurer Farbstoffe in Pflanzenzellen. *Z. Mikrosk.* **57**, 153 (1940).

MANGENOT, G.: Nouvelles observations concernant l'action des colorants vitaux sur les plasmods d' *Fuligo septica*. *C. R. Soc. Biol.* **113** (1933).



OORTH A. J. P.: The spiralgrowth of *Phycomyces*. Proc. Acad. Wetensch. Amsterdam **34**, 4 (1931).

PFEFFER, W.: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Unters. Bot. Inst. Tübingen **2**, 179 (1886).

SCHOPFER, W. H.: Observations sur un pigment de membrane chez *Phycomyces*. Protoplasma **34**, 609 (1940). — SKUPIENSKI, F. X.: Sur la coloration vitale de *Didymium nigripes*. Acta Soc. Bot. Pol. **6**, 203 (1929). — STRUGGER, S.: Vortragsbericht über Vitalfärbung von *Didymium nigripes*. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **54**, 14 (1936); Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenasche Z. f. Naturwiss. **73**, 97 (1940); Die Kultur von *Didymium nigripes* aus Myxamöben mit vitalgefärbtem Plasma und Zellkern. Z. Wiss. Mikr. **57**, 415 (1941); Untersuchungen über die vitale Fluorochromierung der Hefezelle. Flora **37**, 73 (1943); Die Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. Die Naturwissenschaften **34**, 267—273 (1947).

WOESTMANN, E.: Der fluoreszenzoptische Nachweis von *Ustilago tritici* im Weizenkorn. Kühn Archiv **56**, 247—253 (1942).

(Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn.)

## Untersuchungen über die Ökologie und den Massenwechsel bodenbewohnender mikroskopischer Pilze.

### I. Die Bedeutung organischer Nährstoffe für die Entwicklung von *Ophiobolus graminis* in der Rhizosphäre und im freien Boden.

Von

A. GERHARD WINTER.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. April 1949<sup>1</sup>.)

Unsere Kenntnisse von der Ökologie bodenbewohnender parasitischer oder saprophytischer mikroskopischer Pilze sind nur gering. Das wird besonders deutlich bei Durchsicht der Zusammenfassung von NIETHAMMER (1937). Sie versucht lediglich, zwischen bestimmten Bodentypen und dem Auftreten einzelner Pilze oder Pilzgruppen Beziehungen zu knüpfen. Ob ein solches Verfahren genügt, d. h., daß die Klassifizierung der Böden zusammenfällt mit einer Absonderung bestimmter wachstumbestimmender Faktoren, erscheint zumindest in vielen Fällen fraglich. Davon abgesehen fehlen jedoch fast jegliche Erfahrungen, die das Auftreten oder Fehlensein einer Pilzart erklären könnten. Das hat seine Ursache vor allem darin, daß quantitative Untersuchungen über die Entwicklungsmöglichkeiten von mikroskopischen Bodenpilzen in Abhängigkeit von Umweltfaktoren bisher kaum möglich waren. Man hat zwar infolge der praktischen Bedeutung bodenbewohnender Pflanzenparasiten, insbesondere von phytopathologischer Seite, versucht, hier zu neuen Erkenntnissen zu kommen, ist aber in der Regel methodisch gescheitert. So ist es das Verdienst von SCHAFFNIT und seiner Schule, SCHAFFNIT und MEYER-HERMANN (1930), LIESAU (1932), sich eingehender mit den Lebensbedingungen pflanzenparasitischer bodenbewohnender Pilze in ihrem saprophytischen Lebensabschnitt befaßt zu haben. Ihre Untersuchungen und ebenso die Arbeiten von K. O. MÜLLER (1924) über *Rhizoctonia* verlieren bei aller Genauigkeit jedoch wesentlich an Bedeutung, wenn man die Resultate, die im sterilisierten Erdboden gewonnen wurden, auf den natürlichen mikrobendurchsetzten Boden übertragen will. Natürlicher und steriler Boden sind zwei völlig verschiedene Medien, einmal physikalisch-chemisch, insbesondere aber in biologischer Hinsicht. Welche Bedeutung Nahrungskonkurrenz und gegenseitige Beeinflussung der Mikroben durch Bildung oder Zerstörung von Antibiotica, Wirkstoffen, pH- oder R<sub>H</sub>-Änderungen haben, das ergibt die Differenz in den Resultaten des Kulturversuchs eines Organismus in sterilem und natürlichem Boden mit aller Evidenz. Ebenso wenig führt uns die Wahl eines anderen sterilen Mediums weiter. Man denke nur an die unterschiedliche gegenseitige Beeinflussung zweier Organismen auf verschiedenen Böden infolge der Abhängigkeit der Bildung bestimmter Antibiotica vom Substrat. Die Übertragbarkeit in steriler Kultur gewonnener Ergebnisse auf natürliche Böden wird ferner dadurch in Frage gestellt, daß die Bildung bzw. Wirkung der

<sup>1</sup> Von der Redaktion der „Botanica oeconomica“ im Juli 1948 angenommen; die Zeitschrift hat jedoch ihr Erscheinen einstellen müssen.

Antibiotica durch Gegenwart anderer Mikroben beseitigt werden kann. Dieses gilt für das von *Penicillium*-Arten ausgeschiedene Notatin, das von Hefe leicht zerstört wird, und ebenso für eine durch den Verfasser untersuchte *Penicillium*-Art, die ein gegenüber *Ophiobolus graminis* stark wirksames Antibioticum ausscheidet, das durch gleichzeitige Anwesenheit einer *Cladosporium*-Art unschädlich gemacht wird. Da in letztem Fall zudem die Bildung des Antibioticums z. B. nur auf Glykose und Biomalz, nicht aber auf Peptonnährböden erfolgt, ergibt sich hier bereits bei Gegenwart von drei Organismen (*Ophiobolus graminis*, *Penicillium spec.* und *Cladosporium spec.*) und Verwendung von verschiedenen Nährböden eine Vielzahl von Möglichkeiten für das Auftreten und Ausbleiben antibiotischer Erscheinungen. Wieviel komplizierter und unübersichtlicher werden die Verhältnisse im Boden bei der Vielfalt der Organismen und der Mannigfaltigkeit der Nährsubstrate!

Sicher benötigen wir auf der einen Seite die Untersuchung der „Ökologie“ unter sterilen Verhältnissen, um in grundsätzlichen Fragen Klarheit zu erhalten. Bei dem überaus komplexen Geschehen im Boden erscheint es aber zumindest als fernes Ziel, auf diesem synthetischen Wege bis zur Kenntnis der wirklichen Ökologie am natürlichen Standort vorzudringen.

Mit Hilfe einer von WINTER (1947) angegebenen Methode<sup>1</sup> kann die Wirkung verschiedener Umweltfaktoren auf mikroskopische Bodenpilze nunmehr in natürlichem Boden überprüft werden. Allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß jede Änderung des Milieus gleichzeitig die übrigen Bodenorganismen beeinflußt. Das hat bei den zahlreichen Korrelationen zwischen verschiedenen Mikroben zur Folge, daß häufig nicht entschieden werden kann, ob der betreffende Faktor unmittelbar oder indirekt durch Verschiebung anderer Milieubedingungen zur Wirkung kam, und daß seine Wirkung sich der Vorhersage entzieht. Es wird sich zwar in Einzelfällen durch verschiedene Experimente erschließen lassen, in welchen Bahnen der Kausalnexus verlief, doch muß anerkannt werden, daß hier vom Standpunkt rein kausaler Forschung eine Schwierigkeit besteht. Nicht so sehr für den angewandten Wissenschaftler, dem es unter Umständen genügen kann, die Wirkung eines bestimmten Faktors in einem bestimmten Fall zu kennen. Auch ihm bietet genaue Kenntnis der Kausalketten Vorteile, sofern das Geschehen nicht so komplex und verzahnt ist, daß eine Vorausbestimmung des endlichen Resultats den unsicheren Charakter einer „Wettervorhersage“ annimmt.

Die Eigenart des Bodens als physikalisch-chemisch-biotischer Komplex mannigfaltigster Zusammensetzung läßt allerdings erwarten, daß die vielfältige Verflechtung der Komponenten nicht nur eine Aussage über die voraussichtliche Wirkung eines Faktors in einem bestimmten

<sup>1</sup> Bei einem Besuch in Rothhamsted im Mai 1947 ergab sich im Gespräch mit S. D. GARRETT, daß von seinem Schüler J. D. BLAIR 1944 annähernd die gleiche Methode zur Untersuchung von *Rhizoctonia solani* verwendet wurde. Die Arbeit war mir bei der erstmaligen Publikation des Verfahrens (APPEL-Festschrift, 1947) infolge des Krieges bis dahin unbekannt.



Boden, sondern auch die Übertragung der beobachteten Resultate auf einen anderen Boden unmöglich macht.

Nicht selten findet man in der Literatur widersprechende Angaben über die Abhängigkeit verschiedener, durch pflanzenpathogene Bodenpilze verursachter Krankheiten von Kulturmaßnahmen oder der Zufuhr bestimmter Substanzen. So konnte z. B. REA (1939) den Erfolg von KING (1937) in der Bekämpfung des Wurzelparasiten der Baumwolle, *Phymatotrichum omnivorum*, mit Hilfe organischer Dünger nicht bestätigen. Ebenso ist nach GARRETT (1944, S. 103) die von SANFORD (1926) beobachtete schorfvermindernde Wirkung einer Gründüngung durchaus nicht regelmäßig zu erwarten. Man ist nur zu leicht geneigt, diese Angaben auf Ungenauigkeit der Methodik zurückzuführen. Ist es aber nicht denkbar, daß diese Unsicherheit sich bemerkbar macht, sowie der Boden als mitbestimmender Faktor für das Versuchsergebnis auftritt? Sind nämlich zwei Böden, die verschiedenen Orts für den gleichen Versuch verwandt wurden, nicht zumeist so verschieden in ihren physikalisch-chemischen und biotischen Eigenarten, daß bei nur allzu leicht zu erwartenden mittelbaren Kausalketten der Pilz von gleichen Faktoren im Endeffekt unterschiedlich, ja invers, beeinflußt wird? Es besteht darüber hinaus die Frage, ob die Änderung eines Faktors im natürlichen Boden überhaupt gesetzmäßige Beziehungen zum Wachstum eines Bodenpilzes erkennen läßt, wie wir das von sterilen Kulturen als Regel kennen. Ist es also z. B. selbstverständlich, daß eine Gründüngung oder andersartige organische Stoffzufuhr bei hemmender Wirkung auf einen parasitischen Bodenpilz in doppelter Menge eine gleichsinnige gesteigerte Wirkung erkennen läßt? Wäre es nicht bei der möglicherweise in diesem Vorgang verknüpften Vielfalt von ineinandergreifenden Prozessen denkbar, daß bei veränderter Gabe eine inverse Wirkung auftritt und bei gleichmäßig fortgesetzter Steigerung Hemmung und Förderung unregelmäßig wechseln?

Das Ziel der nachstehenden Arbeit ist, dieser grundsätzlichen Frage nachzugehen.

#### A. Allgemeines zur saprophytischen Entwicklung von *Ophiobolus graminis*.

Die Ökologie von *Ophiobolus graminis* ist durch frühere Untersuchungen (GARRETT, WINTER) weit eingehender als die der meisten anderen mikroskopischen Bodenpilze am natürlichen Standort bekannt geworden. Zudem hat dieser Pilz infolge seiner morphologischen (im Boden leicht erkennbar) und physiologischen (durch Antibiotica leicht zu beeinflussen) Eigenheiten für solche Untersuchungen besondere Vorzüge. Schließlich fällt dieses Problem weitgehend zusammen mit der Bekämpfung bodenbewohnender Pflanzenparasiten in Abwesenheit ihrer Wirtspflanzen

durch Zersetzung ihres Mycels in Pflanzenresten bzw. durch Hemmung ihrer saprophytischen Entwicklung.

Wir wußten bis vor kurzem sehr wenig darüber, wie weit und ob es möglich ist, die Bodenverseuchung durch kulturelle Maßnahmen herabzusetzen. Das hat die bereits angeführten Gründe: Überschätzung des saprophytischen Wachstums durch Berücksichtigung der in künstlicher Kultur oder sterilisiertem Boden zu erreichenden Entwicklung und die Unmöglichkeit, das Wachstum der Pilze im Boden quantitativ zu erfassen.

Es ist insbesondere das Verdienst von GARRETT (1938), in diese Gebiete mit neuartiger Methodik vorgestoßen zu sein. GARRETT ließ Weizenhalme, die mit einer Abkochung von string beans (1 l b. str. b. in 4 l Leitungswasser für 4000 5 cm lange Strohhalme) getränkt waren, 1 Monat bei 25° C steril von *Ophiobolus graminis* durchwachsen, brachte sie dann in den Boden und untersuchte in verschiedenen Abständen ihre Infektionsfähigkeit auf folgende Weise: Die Halme wurden aus dem Boden herausgewaschen, aufgespalten und in den Spalt ein Weizenkorn eingeführt und das Ganze in feuchten Sand gelegt, in dem *O. graminis* die stärkste Infektionskraft entfaltet. Im Verlauf seiner Untersuchungen kam GARRETT zu der Feststellung, daß die Zersetzung des Mycels am raschesten bei mittleren Temperaturen, günstiger Bodenfeuchtigkeit und guter Durchlüftung erfolgt. Ebenso beschleunigen Zugaben N-armer Stoffe wie Glykose, Stärke oder rye-grass meal zum Boden die Zerstörung des Mycels. In entgegengesetzter Richtung wirken N-reiche Stoffe wie getrocknetes Blut oder anorganische N-Verbindungen. GARRETT nahm zunächst an, daß bei N-Mangel antagonistische Mikroben das *Ophiobolus*-Mycel als N-Quelle angreifen und dementsprechend alle Faktoren, die die Mikrobenentwicklung fördern und dadurch N-Mangel auslösen, zu einer raschen Zerstörung des Mycels führen. Weitere Untersuchungen zeigten dann aber, daß das *Ophiobolus*-Mycel seine Vernichtung in den Zellen der Halme nicht untätig erwartet. Vielmehr erfolgt im Boden eine weitere Entwicklung des Pilzes in den Halmen durch Ausbildung dunkler Hyphen. Diese ist aber infolge der N-Armut des Substrates weitgehend vom N-Gehalt des Bodens bestimmt. Setzt durch Zugabe von N-armen Stoffen wie Glykose und dergleichen eine Überentwicklung von Mikroben ein, so ist der vorhandene Stickstoff rasch verzehrt, *O. graminis* muß sein Wachstum einstellen und verfällt damit der Auflösung. Umgekehrt fördern N-Gaben die *Ophiobolus*-Entwicklung im Stroh, beschleunigen so die Zersetzung des Strohs und verzögern den Beginn des Mycelzerfalls. Dementsprechend erweist sich auch das Stroh, wenn *Ophiobolus* rasch abstirbt, als wenig, bei langer Lebensdauer des Pilzes als stark zersetzt.

Allerdings gräbt *O. graminis* damit auf längere Sicht sein Grab (siehe unten). Es setzt nämlich relativ lange Erhaltung des Mycels im Boden relativ rasche Zersetzung des Strohs voraus. Infolge dieser sich von einer gewissen Grenze ab gegenseitig ausschließenden Erscheinungen ist der Erhaltung der Infektionskraft des Pilzes im Stroh mit der restlosen Zerstörung des Gewebes durch *O. graminis* eine natürliche, ziemlich tiefe Grenze gesetzt. Entweder muß die Infektionskraft verschwinden, weil das zu langsam wachsende Mycel zerfällt, oder die Hyphen gehen bei guten Wachstumsbedingungen ein, weil das Stroh ganz zersetzt ist. Bei beschränkter, für den Pilz erreichbarer Strohmenge müßte daher bei mittleren Wachstumsbedingungen, die eine Mycelzersetzung noch gerade verhindern, aber mit dem Cellulosevorrat sparsam wirtschaften lassen, die Verseuchung am längsten erhalten bleiben. Wenn GARRETT diese Gesetzmäßigkeit nicht beobachtete, so kann

das — weitgehende Parallelität zwischen N-Gehalt und Strohzersetzung vorausgesetzt — nur darin begründet sein, daß er bei den Stickstoffgaben mengenmäßig nicht genug variierte und die Grenze, die durch den Cellulosevorrat im Stroh gesetzt ist, nicht erreicht wurde.

GARRETT sieht also nach anfänglichen Erklärungsversuchen in anderer Richtung den Vorgang der Mycelbildung — allerdings innerhalb des Halmgewebes — als entscheidend für die Erhaltung der Bodenverseuchung an. Ohne Kenntnis dieser Arbeit (GARRETT 1940) hat WINTER (1947) auf Grund seiner Beobachtungen über das Wachstum von *O. graminis* auf CHOLODNY-Platten geschrieben: „Dem saprophytischen Wachstum von *O. graminis* könnte also doch größere Bedeutung zukommen, als nach den Beobachtungen GARRETTs (1938) und eigenen Erfahrungen (WINTER 1942) anzunehmen war. Bei den eigenen Untersuchungen reichte die angewandte Methodik (direkte Beobachtung des Mycels an der Bodenoberfläche mit dem Binokular) nicht aus, um die hier auftretenden feinen Unterschiede zu erfassen; denn das mag hier noch hervorgehoben werden: Das Wachstum im Boden wird bei Bodenpilzen zumeist so schwach sein, daß es mit den Verhältnissen auf künstlichen Nährböden nicht zu vergleichen ist. Es ist aber dann zu berücksichtigen, daß jahrelang vorhandene minimale Unterschiede in der Pilzentwicklung sich summieren und dann doch wirksam in Erscheinung treten können.“

GARRETT konnte bei seiner Untersuchungsmethodik jedoch das saprophytische Wachstum, das sich eventuell von den infizierten Halmen aus in den Boden hinein vollzieht, nicht erfassen, da er die Halme nach dem Entfernen aus dem Boden gründlich abwusch. Diese Tatsache verdient besondere Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit der von FELLOWS (1941) und RUSSEL (1934) gemachten Beobachtung, daß zwar der größte Teil des Pilzmycels ziemlich rasch verschwindet, daß aber ein merklicher Teil der Infektionskraft des Bodens (bei völliger Abwesenheit von irgendwelchen höheren Pflanzen) über zwei Jahre erhalten bleibt. Künstlich infizierte Strohstückchen waren dagegen (GARRETT 1940) im Feld nach 11 Monaten (September bis Juli) nur noch in einem von hundert Fällen, natürlich infizierte Strohteile nach der gleichen Zeit noch in dreizehn von hundert Fällen infektiösfähig. Das deutet wohl darauf hin, daß wir zwischen einer Infektionsfähigkeit des Bodens und der Langlebigkeit des Mycels im Stroh unterscheiden, d. h., daß wir das Wachstum des Pilzes von dem infizierten Stroh aus in den Boden hinein berücksichtigen müssen, wenn wir die gegenüber mycel-durchwachsenen Strohhalmen längere Infektionsfähigkeit des gesamten Bodens verstehen wollen.

Der Nachweis saprophytischer Entwicklung, die unabhängig vom Gewebe befallener Pflanzen oder von anderweitig eingebrachten Nährstoffen frei im Boden erfolgt, konnte vom Verfasser durch den nachfolgenden Versuch erbracht werden. Er untersuchte (Abb. 1) die Hyphenentwicklung aus einem von *Ophiobolus* durchwachsenen Stückchen Biomalzagar von 6 mm Durchmesser auf Objektträgern in natürlichem und bei 100° C in strömendem Dampf partiell sterilisiertem Lößlehm mit geringem Humusgehalt. Die Objektträger wurden auf den Boden von Petrischalen gelegt, mit dem gleichmäßig feuchten (40% der m. W. K.) und gekrümelten Boden bedeckt und im Thermostaten bei 20° C und konstanter Bodenfeuchtigkeit gehalten. Nach verschiedenen, aus der Abb. 1 ersichtlichen Zeiten, wurden Objektträger aus den Schalen entnommen und das Wachstum des Pilzes gemessen (siehe unten). Das



Wachstum im unbehandelten Boden stieg bis zur 25. Woche langsam an, dagegen fiel das zunächst starke Wachstum im partiell sterilisierten Boden steil ab und erhöhte sich später wieder, so daß es schließlich die gleichen Werte wie im natürlichen Boden erreichte.

In den schon im Augenblick des Einbringens in den Boden nährstoffarmen Agarplättchen können schwerlich nach einem monatelangen Verbleiben im Boden und damit verbundener Besiedlung durch verschiedenste Bodenmikroben noch irgendwelche Reste des leicht zu verwer-



Abb. 1. Wachstum der Laufhyphen von *Ophiobolus graminis* auf Glasplatten nach verschieden langem Verbleiben in partiell sterilisiertem und natürlichem Boden (Lößlehm, 40% m. W. K.).

tenden Biomalz vorhanden sein. Es muß sich daher das Mycel in den letzten Monaten aus den im Boden vorhandenen Nährstoffen, wenn auch schwach, entwickeln können. Das Absinken der Ausdehnung des Pilzes im partiell sterilisierten Boden erklärt sich so, daß zunächst durch Überentwicklung von *Actinomyceten* (vgl. hierzu die ausführlichen Erläuterungen der Kurve bis zur 17. Woche bei WINTER 1949) eine Zerstörung des größten Teils der *Ophiobolus*-Hyphen erfolgt und nur die älteren, den Impfstücken näheren Partien teilweise erhalten blieben. Aus ihnen, die also zumeist gar keinen Konnex mehr mit den fast ganz zersetzten Impfstücken haben, regeneriert sich nun das Mycel, wenn die Überentwicklung der *Actinomyceten* abgeklungen und der Boden nach etwa einem halben Jahr zum Normalzustand zurückgekehrt ist. Es entwickelt sich relativ kräftig und erreicht bald die gleiche Ausdehnung wie in natürlichem Boden.

Die Existenz freier Mycelien außerhalb des befallenen Pflanzengewebes, sei es, daß sie die Nahrungsstoffe aus der Bodenlösung aufnehmen, sie aus Geweberesten im Boden frei machen (verstärkte Entwicklung in der Nähe und Durchsetzung von Pflanzenresten durch

*Ophiobolus graminis* ist auf den Objektträgern häufig zu erkennen) oder in bereits befallenen Pflanzenteilen weiterwuchern, ist also anzunehmen und offensichtlich von erheblicher Bedeutung für die Biologie und den Massenwechsel des Pilzes. *Die Untersuchung dieser Mycelentwicklung in Abhängigkeit vom Nährstoffgehalt des Bodens ist das Ziel der vorliegenden Arbeit.*

Zu klären bleibt außerdem die Frage, ob der Mycelzersetzung in den Stoppeln oder der Entwicklung der saprophytischen Mycelien im Boden die größere praktische Bedeutung zukommt. Häufiger Anbau anfälliger Pflanzen in Abständen von nur 1 oder 2 Jahren wird soviel verseuchte Stoppeln in den Boden bringen, daß die Beschleunigung ihrer Zersetzung vordringlichstes Ziel aller Kulturmaßnahmen sein muß. Die saprophytische Durchdringung des Bodens wird daneben so bedeutungslos, daß in ausgesprochenen Weizenländern der Schwerpunkt der Bekämpfung ausschließlich in der Forcierung der Stoppelzersetzung liegen muß. Trennt dagegen ein mehrjähriger Abstand das Erscheinen der Wirtspflanzen, so gewinnt die Unterdrückung der saprophytischen Entwicklung an Bedeutung, da sie nach der oben erwähnten relativ raschen Zersetzung des Mycels in den Stoppeln alleinige Trägerin der Bodenverseuchung wird. Welchem Vorgang also unser größeres Interesse vom praktischen Standpunkt aus gehören muß, hängt von der jeweiligen Fruchtfolge ab.

Es soll mit diesen Untersuchungen über die Mycelentwicklung keineswegs der Nachweis erbracht werden, daß ein solcher Vorgang für die Ausbreitung des Pilzes im Boden, d. h. für das Vordringen in unverseuchte Areale von Bedeutung ist. Dafür ist diese Art des Wachstums gegenüber der Möglichkeit, größere Entfernungen durch Parasitierung anfälliger Pflanzen oder in der Rhizosphäre nicht anfälliger Arten (WINTER 1948) zurückzulegen, zu geringfügig. Auch haben PADWICK (1935), ADAM und COLQUHOUN (1936) sowie FELLOWS und FICKE (1939) die Bedeutungslosigkeit solcher Erscheinungen überzeugend dargelegt. Nur ihr Anteil bei der Erhaltung der Bodenverseuchung durch saprophytische Entwicklung ist in diesem Zusammenhang wichtig.

Es erscheint von besonderem Interesse, den Einfluß der zu prüfenden Faktoren in Parallelversuchen auf die sogenannten Laufhyphen des Pilzes zu untersuchen. Sie sind ein Teil der parasitischen Phase, wachsen aber unter ständigem Abzweigen farbloser, feinverzweigter Infektionshyphen in das Wurzelinnere als dunkle Hyphen auf der Wurzeloberfläche anfälliger Pflanzen. So sind sie unter optimalen Ernährungsbedingungen doch allen anderen Einflüssen in der Rhizosphäre ausgesetzt. Die Untersuchung der Laufhyphen hat daher zwei Vorteile. Sie ermöglicht den Vergleich der in der Rhizosphäre und im freien Boden herrschenden Bedingungen und erlaubt infolge der optimalen Ernährung des Pilzes indirekte Wirkungen von Nährstoffen zu isolieren.

## B. Zur Methodik.

### 1. Die saprophytische Phase von *Ophiobolus graminis*.

Aus gut vom Pilz durchwachsenen Biomalzagarplatten (10 cm<sup>3</sup> je Petrischale) wurden mit dem Korkbohrer 5 mm große Stücke herausgestanzt und zu je zweien auf Glasplatten gebracht, die auf der Unterseite mit Fettstift beschriftet, auf den

Boden von Petrischalen gelegt und dann mit Erde gleichmäßig locker bedeckt wurden. Beschriftung mit Fettschrift auf der Oberseite muß vermieden werden, da *Ophiobolus graminis* und andere Bodenpilze das Fett leicht zersetzen und auf und um die Beschriftung ein dichtes, kräftiges Mycel bilden. Die lockere Bedeckung erfolgte, damit nicht der Kohlendioxydgehalt der Bodenluft für den sehr CO<sub>2</sub>-empfindlichen Pilz (WINTER 1939) zum begrenzenden Faktor wurde, und seine Veränderung durch Zufuhr organischer Nahrung störend in die Versuchsergebnisse eingriff. Die Böden waren luftgetrocknet, gesiebt und in einer Neubauerschale mit aqua dest., das den jeweils angegebenen Prozentsatz an Biomalz, Pepton, Glykose usw. in gelöster Form enthielt, bis zu 40% der m. W. K. unter gründlichster Durchmischung abgesättigt und zum Teil in lufttrockenem Zustand 2 Std in strömendem Dampf bei 100° C partiell sterilisiert. Nach 14tägiger Aufbewahrung bei konstanter Temperatur wurden die Objektträger herausgenommen und die Entfernung zwischen Agarrand und den am weitesten vorgedrungenen Hyphen in 4 aufeinander senkrechten Richtungen mit Hilfe eines Kreuztisches bestimmt. Jedem Einzelwert liegen dabei in der Regel 90—110 Messungen zugrunde, so daß innerhalb eines Versuches auftretende Schwankungen weitgehend ausgeglichen werden. An sich wäre für jeden Wert die Feststellung des mittleren Fehlers wünschenswert gewesen. Sie war nicht ohne einen unverhältnismäßig hohen Arbeitsaufwand durchführbar, da dieser Arbeit insgesamt etwa 40000 Messungen zugrunde liegen. Um diesem Mangel abzuweichen, wurde zu einer großen Anzahl von Versuchen eine dreifache Kontrolle ohne Nährstoffzusatz angesetzt. Die Werte sind jeweils rechts von den Kurven eingetragen. An Hand der Streuung zwischen den zusammengehörenden Kontrollen kann man die Bedeutung der nach Nährstoffzusatz auftretenden Wachstumsschwankungen annähernd beurteilen und entscheiden, ob sie mit dem variierten Faktor in Zusammenhang gebracht werden können. Diese weitgehende Sicherung der experimentellen Ergebnisse gegen die trotz peinlich genauer Versuchsdurchführung in der Methode selbst begründete Streuung ist von grundlegender Bedeutung.

Trotz diesen ständigen Kontrollen der Versuchsergebnisse galt es, die Werte durch Herabsetzung der beobachteten Schwankungen nach Möglichkeit weiter zu verbessern. Insbesondere könnte das Alter der verwendeten Kulturen und bei Gebrauch gleichaltriger Herkünfte der Ort auf der Agarplatte, von dem das Plättchen stammt, das Wachstum beeinflussen. Der Pilz vollzieht nämlich im Boden, zumindest bei kurzer Versuchsdauer, sein Wachstum hauptsächlich aus dem Nährstoffgehalt des Plättchens. In einer feuchten Kammer dringen aus solchen Agarstückchen kräftige Hyphen hervor und wachsen vereinzelt bis zu 35 mm über den Objektträger. Es könnte also namentlich bei jungen, gerade bis zum Rande der Schale gewachsenen Kolonien von Bedeutung sein, ob das Agarstückchen vom Rande einer Kolonie oder aus der Mitte stammt. Der Nährboden in der Mitte wird ziemlich erschöpft sein, während in den mehr sklerotischen Geweben erhebliche Reserven gespeichert sind. Der Agar am Rande dagegen ist bei jungen Kulturen nährstoffreich, das Pilzmycel aber noch arm an Reservestoffen. Die Agarstückchen werden nun im Boden leicht von Bakterien und Pilzen besiedelt. Dann bieten die Agarstückchen vom Rande einer jungen Kolonie infolge ihres Reichtums an Nährstoffen und des Fehlens antibiotischer Stoffe nur zu leicht bessere Bedingungen zur Ansiedlung und damit zur Nahrungskonkurrenz oder gar zur Ausscheidung für *Ophiobolus graminis* ungünstiger Stoffwechselprodukte. Auf älteren *Ophiobolus*-Kulturen siedeln sich dagegen, auch wenn man sie stärksten Infektionen durch Luftkeime aussetzt, kaum jemals Mikroben an.

Es mußten daher einmal das Wachstum verschiedenaltiger Kulturen und andererseits der Rand und Mittelpartien gleichaltriger Kulturen



verglichen werden. Das Ergebnis eines solchen Versuches zeigt die Tab. 1.

Der innerste Teil, aus dem Agarstückchen entnommen wurden, ist ein Kreis mit 14 mm Radius um den Mittelpunkt. Längs dieses Kreises wurden die Scheibchen ausgestochen. Die mittleren Plättchen stammen aus einem Kreis mit 28 mm Radius, die äußeren aus dem peripheren Kreis am Rand der Schalen mit etwa 40 mm Radius. Der Versuch begann am 8. 4., als der Pilz in der am 30. 3. beimpften Platte gerade den Rand der Petrischalen erreicht hatte.

Tabelle 1.

Datum, an dem die Platten beimpft wurden	Wachstum nach 14 tägiger Versuchsdauer bei 20°.		
	Die Plättchen sind entnommen aus den Petrischalen vom		
	inneren Teil	mittleren Teil	äußeren Teil
Juli 1947 . . . . .	0,4	0,3	0,1
Herbst 1947 . . . . .	0,1	0,1	0,1
„ 1947 . . . . .	0,1	0,1	0,1
2. März 1948 . . . . .	1,8	1,6	1,3
2. „ 1948 . . . . .	1,1	1,0	1,9
2. „ 1948 . . . . .	1,5	1,0	1,5
16. „ 1948 . . . . .	1,3	1,1	1,1
16. „ 1948 . . . . .	0,9	1,0	1,0
30. „ 1948 . . . . .	1,0	1,2	1,6
30. „ 1948 . . . . .	1,3	1,4	1,3
30. „ 1948 . . . . .	1,1	1,3	1,4

Altersunterschiede der Kultur von einem Monat sind also ohne Bedeutung. Erst bei sehr alten Platten zeigt sich eine allerdings erhebliche Schwächung der Entwicklung. Es ist in jedem Fall bedeutungslos, ob das Plättchen vom Rande, dem Zentrum oder dem mittleren Teil der Kultur entnommen wird. Trotzdem wurde bei allen Versuchen darauf gesehen, daß für jeden Wert (100 Messungen) jeweils Agarstückchen aus allen Zonen der Schalen gleichmäßig entnommen wurden.

In den natürlichen Böden stimmen die 3 Kontrollwerte (vgl. Abb. 6, 8, 10) jeweils gut überein. Nur in den partiell sterilisierten Böden zeigen sich vereinzelt auffallende Differenzen. Alle Faktoren für die drei gleichzeitig laufenden Kontrollen waren aber konstant, nur die sehr gründlich vollzogene Durchmischung mit dem Wasser wurde in getrennten Neubauerschalen durchgeführt. Die Störungen sind daher vermutlich auf die in diese biologisch nicht mehr ausbalancierten Substrate wie in ein Vakuum einströmenden Infektionen (es wurde mit ihnen nur sehr sauber, aber nicht steril gearbeitet) zurückzuführen. Sie müßten nach explosionsartiger Übervermehrung (man denke an die Entwicklung von *Pyronema confluens* in partiell sterilisierten Böden) erhebliche Wachstumshemmungen für *Ophiobolus graminis* auslösen können. Alle zu-

gehörigen Einzelwerte der betreffenden Kontrolle zeigen dabei gleichbleibend den niedrigen Wert.

Eine gleichzeitige Reihe von drei Kontrollwerten ließ in natürlichen Böden also gute Übereinstimmung erkennen. Zu anderer Zeit ergaben aber Kontrollen mit den gleichen Böden bei unveränderten Versuchsbedingungen plötzlich andere, aber wiederum in sich einheitliche Werte. So liegen die drei Kontrollen zu dem Glykoseversuch (Abb. 8) in unsteriler Gartenerde bei 2,2, 2,7 und 2,9 mm, während bei dem Versuch mit Pepton für die Kontrollen in natürlichem Lößlehm (Abb. 6) 3,5, 4,2 und 4,7 mm und bei Biomalz schließlich 5,3, 6,1 und 7,2 mm gemessen wurden. Temperatur, Feuchtigkeit, Herkunft und Vorbehandlung der Erde (zu gleicher Zeit getrocknet, gesiebt und gleichmäßig durchmischt) und Dauer des Versuchs waren gleich. Der einzige Unterschied bestand darin, daß der Glykoseversuch am 15. 10., der mit Biomalz am 16. 10. und der mit Pepton am 17. 10. angesetzt wurde.

Nach den Erfahrungen von BORTELS (1940, 1941) lag es nahe, diese Erscheinung auf Wetterfaktoren unbekannter Natur zurückzuführen. Es wurde daher das Wachstum des Pilzes in Lößlehm und Komposterde in Abständen von 14 Tagen gemessen. Die Erdproben entstammen einer einheitlichen Menge, die seit mehreren Monaten im getrockneten und gut durchmischten Zustand aufbewahrt wurde. Es wurden in jeder Bodenart jeweils vier Wiederholungen mit je 100 Messungen durchgeführt. Die vier Parallelen wurden getrennt in vier Neubauerschalen mit Wasser bis zu 40% der maximalen Wasserkapazität gemischt. Die *Ophiobolus*-Kulturen waren stets gleich alt. Sie wurden 14 Tage vorher beimpft und anschließend bei 25° C gehalten. Es wurde ein Einsporenstamm zu diesen wie zu allen anderen Untersuchungen gebraucht. Der Versuch wurde ab 16. 3. bis 24. 8. in regelmäßigen Abständen neu angesetzt. Die vier Einzelwerte, die sich, wie gesagt, auf je 100 Messungen stützen, zeigen jeweils sehr gute Übereinstimmung (Abb. 2). Die Wieder-

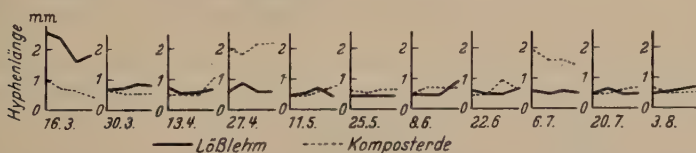


Abb. 2. Saprophytisches Wachstum von *Ophiobolus graminis* in jeweils vier gleichzeitig angesetzten Kontrollen in Komposterde und Lößlehm. Die Versuchsbedingungen sind bei allen Wiederholungen identisch, nur das Datum des Versuchsbeginns ist jeweils um 14 Tage verschoben. Auftreten von Sprüngen am 16. 3. in Lößlehm, am 27. 4. und 6. 7. in Komposterde.

holungen gaben bis auf drei Ausnahmen stets die gleichen Werte. In dem Lößlehm ist das Wachstum vom 16. 3.—30. 3. eindeutig höher als in sämtlichen anderen Versuchsreihen, und ebenso schnell in der Komposterde das Wachstum in der Zeit vom 27. 4.—11. 5. und 6. 7.—20. 7.

auf den doppelten bis dreifachen Wert. Diese Unterschiede sind noch stärker, als die Zahlen erkennen lassen, weil in der Versuchsserie mit den Werten 0,5—1,0 stets nur ganz vereinzelt unverzweigte, verkümmerte Hyphen auswuchsen, während bei den Reihen mit besserem Wachstum gleichzeitig sich das Mycel verdichtete, viel kräftiger wuchs und sich reichlich verzweigte.

Die Schwankungen in der Komposterde und dem Löblehm treten nicht gleichzeitig auf. Es läßt sich also keine unmittelbare Beziehung

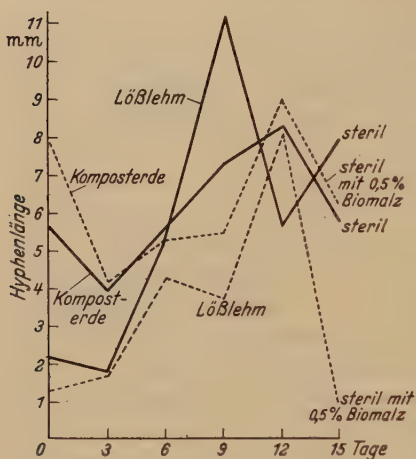


Abb. 3. Saprophytisches Wachstum von *Ophiobolus graminis* in partiell sterilisierter Komposterde und ebenso behandeltem Löblehm mit und ohne Zusatz von 0,5% Biomalz. Auf der Abszisse ist die Zeit in Tagen eingetragen, die zwischen der partiellen Sterilisation und dem Versuchsbeginn verstrichen ist. Versuchsdauer jeweils 14 Tage.

zwischen Witterungsverlauf oder einem anderen mit der Zeit veränderlichen Faktor und *Ophiobolus*-Wachstum erkennen.

Nimmt man aber an, daß der BORTELSSche Wachstumsfaktor oder ein anderer Einfluß auf die gesamten Bodenmikroben einwirkt, dann steht auch kaum zu erwarten, daß *Ophiobolus graminis* in beiden Böden zu gleicher Zeit reagiert. Der begrenzende Faktor für die Entwicklung ist vor allem der Gehalt der Bodenlösung an Hemmungsstoffen (WINTER 1942, 1948). Bei der Vielfalt der Organismen, die wahrscheinlich an ihrer Produktion mitwirken (WINTER 1942), ist ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Wetterfaktoren und der Entwicklung des Pilzes nicht zu erwarten. Ebenso wenig ist bei den starken mikrobiologischen Unterschieden zwischen Kompost und Löblehm anzunehmen, daß sich die Steigerung im Wachstum gleichzeitig in beiden Böden zeigen muß. Auch BORTELS (1940) beobach-

tete, daß der Einfluß der Wetterlage auf die N-Bindung von *Azotobacter* in Erde viel undeutlicher ist als in Nährlösung. Eine Entscheidung in dieser Frage wäre allerdings nur zu erreichen, wenn der Versuch mit den gleichen Böden, dem gleichen Impfmateriel und unter gleichen Bedingungen an verschiedenen Orten Deutschlands oder Europas gleichzeitig durchgeführt würde. Die Verschiebung der Zyklogen, die ja nach BORTELS mit dem maßgebenden Faktor bei der Wetterbeeinflussung gekoppelt ist, müßte sich dann in einer Phasenverschiebung der Wachstumssteigerung bemerkbar machen.

Auch das Auftreten besser wachsender Mutanten erklärt nicht die plötzlich auftretenden Entwicklungssprünge. Es wäre dann nicht zu verstehen, daß bei Verwendung des gleichen Impfmateriels das bessere Wachstum (bei völliger Einheitlichkeit der Werte im Kompost bzw. dem Löblehm) nicht in beiden Böden gleichzeitig auftritt und im nächsten Versuch wieder verschwindet.



Sieht man von diesen also relativ selten auftretenden Sprüngen ab, so ist während eines Versuches die Konstanz der Bedingungen weitgehend gewahrt. Dagegen müssen wir nach der partiellen Sterilisation mit dauernden und überaus starken Verschiebungen im Bodenzustand rechnen (Abb. 3). Das am Ende einer Versuchsperiode von 14 Tagen erhaltene Ergebnis setzt sich also nicht aus 14 gleichen Tagesresultaten zusammen. Vielmehr finden im Boden dauernd Veränderungen statt, die an jedem Tag nach der partiellen Sterilisation das Pilzwachstum anders beeinflussen. Besonders interessant ist der Kurvenverlauf in der Gartenerde. Wir haben hier einen der immer wieder einmal auftretenden Fälle vor uns, wo die partielle Sterilisation bei unmittelbarer Beimpfung unwirksam ist (2 mm werden auch im natürlichen Boden erreicht). Hier tritt erst später die wachstumssteigernde Wirkung der partiellen Sterilisation in Erscheinung. Da der Verfasser (1942) an anderer Stelle gezeigt hat, daß bei der partiellen Sterilisation auch für *Ophiobolus graminis* toxische Stoffe gebildet werden, ist der Kurvenverlauf in der Gartenerde vielleicht so zu verstehen, daß solche durch die Erhitzung auftretenden Stoffe zunächst zerstört werden, nach 12 Tagen sich aber die Rückbildung des alten Gleichgewichtes bemerkbar macht.

Es muß daraus gefolgert werden, daß partiell sterilisierte Böden unmittelbar nach der Erhitzung und gleichzeitig zu verarbeiten sind.

## 2. Die parasitische Phase von *Ophiobolus graminis*.

Die quantitative Messung der Laufhyphenentwicklung nach der Methode von GARRETT ist vom Verfasser in früheren Arbeiten ausführlich beschrieben (vgl. WINTER 1942). Kleine pilzdurchwachsene Agarstückchen werden so unter die Samen gelegt, daß die Wurzeln durch sie wachsen müssen. Die Laufhyphen wachsen dann an den Wurzeln entlang. Ihre größte Ausdehnung wird unter dem Binokular (Auflicht) bestimmt.

## C. Die Beeinflussung der saprophytischen Entwicklung von *Ophiopolus graminis* durch organische Nährstoffe.

Ökologie und Massenwechsel parasitischer und saprophytischer Pilze dürften in engem Zusammenhang mit dem Vorkommen organischer Stoffe stehen. Doch muß die Nährstoffkonkurrenz und die unterschiedliche Reaktion der übrigen Bodenmikroben auf organische Nährstoffzufuhr in leicht angreifbarer Form (vgl. WAKSMAN und STARKEY 1924) im Verein mit nachfolgenden Verschiebungen im mikrobiologischen Gleichgewicht durch antibiotische Kräfte die Wirkung auf einen Organismus, namentlich, wenn er antibiotisch empfindlich ist, gegenüber den Verhältnissen in Reinkultur abändern. Es bedarf daher einer Prüfung, wie weit die Verhältnisse im Boden Ähnlichkeit mit den in flüssigen oder auf festen Nährböden zu beobachtenden Beziehungen zwischen

Pilzentwicklung und Nährstoffkonzentration haben. Um die Zusammenhänge möglichst klar zu übersehen, wurde das Wachstum des Pilzes in Abhängigkeit von bestimmten Nährstoffen auf Agargallerten verschiedener Zusammensetzung und in Böden geprüft, die einen allmählichen Übergang zu den im natürlichen Boden herrschenden Verhältnissen darstellen.

Pepton (Witte), Glykose und Biomalz wurden in einer Konzentration von 0,15, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 und 5% einem Agar, der mit Leitungswasser oder

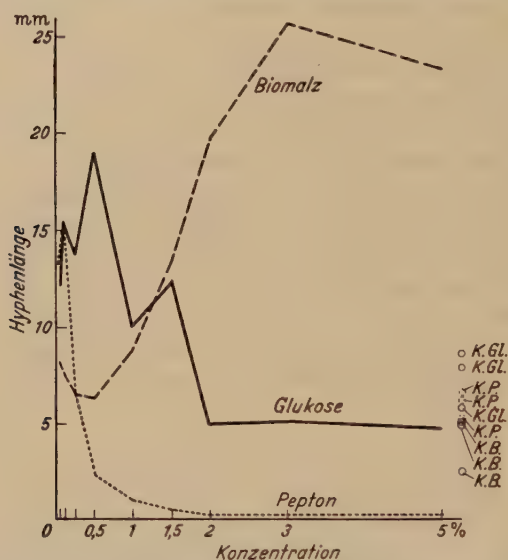


Abb. 4. Saprophytisches Wachstum von *Ophiobolus graminis* auf Glasplatten in Sand nach Zugabe verschiedener Mengen von Biomalz, Glykose und Pepton. K. B. = Kontrolle Biomalz, K. GL. = Kontrolle Glykose, K. P. = Kontrolle Pepton.

mit einem sterilisierten Extrakt einer Komposterde bzw. eines Lößlehms angesetzt war, zugefügt. Gleiche Gaben wurden Lößlehm und Komposterde, oder einem 2 Std bei 100° C partiell sterilisierten Lößlehm bzw. gleichbehandelter Komposterde und einem feinen, chemisch reinen Sand beigemischt.

Der Agar wurde in Petrischalen ausgegossen und in der Mitte beimpft. Nach 7tägiger Versuchsdauer bei 25° C wurde auf jeweils 6 Schalen der Durchmesser der Kolonien bestimmt.

Sand und Erde waren lufttrocken und gleichmäßig gesiebt. Sie wurden mit der jeweiligen Konzentration des Nährstoffes in Leitungswasser bis zu 40% der maximalen Wasserkapazität angefeuchtet. Darauf wurde das Wachstum des Pilzes in diesen Böden in der oben beschriebenen Weise bei 19° C in 14tägiger Versuchsdauer auf Objektträgern bestimmt. Jedem Einzelwert liegen 100 Messungen zugrunde.

Bei der Untersuchung des Wachstums auf Agar wurde sehr häufig eine Schwankung in der Myceldichte beobachtet, die bei der Bestimmung der Entwicklung an Hand des Koloniedurchmessers nicht erfaßt wurde. Es scheint daher zunächst

exakter, die Mycelentwicklung in Flüssigkeitskulturen gravimetrisch zu bestimmen. Dagegen spricht aber, daß *Ophiobolus* so gut wie nicht in Lösungen, einerlei welcher Zusammensetzung, wächst, und daß auch bei der Messung des Wachstums im Boden Schwankungen in der Dichte des Mycels auftraten, die jedoch nicht berücksichtigt werden konnten, da eine einwandfreie Messung der Hyphendichte nicht möglich ist. Es erscheint daher bei Vergleichen am korrektesten, sowohl auf dem Agar wie im Boden die Schwankungen in der Myceldichte außer Betracht zu lassen und den damit entstehenden Fehler in Kauf zu nehmen.

Beginnen wir mit der Besprechung der Wirkung des Peptons (Abb. 4, 5, 6). Sowohl auf dem Leitungswasseragar wie dem Kompost- bzw. Löblehmextraktagar läßt sich die bis 5% herauf wachstumssteigernde Wirkung des Peptons klar erkennen. Im Sand fördern dagegen zwar ganz schwache Konzentrationen, stärkere Gaben (von 0,5% ab) hemmen aber

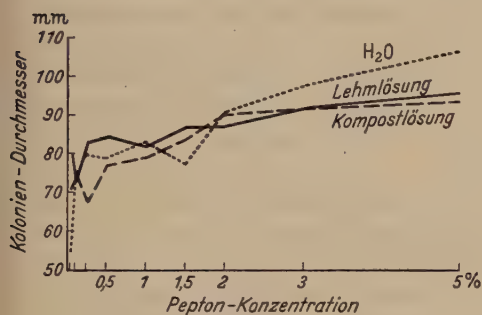


Abb. 5.

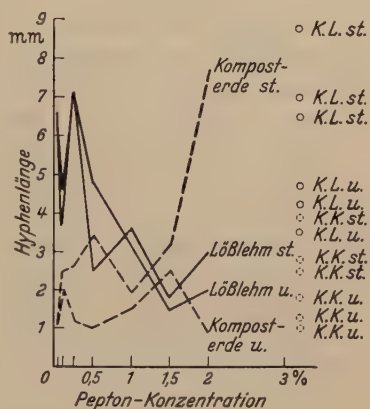


Abb. 6.

Abb. 5. Wachstum von *Ophiobolus graminis* in steriler Kultur auf Leitungswasser-Agar bzw. einem mit sterilem Löblehm- oder Komposterde-Extrakt angesetzten Agar nach Zugabe verschiedener Peptonkonzentrationen.

Abb. 6. Saprophytische Entwicklung von *Ophiobolus graminis* in Löblehm und Komposterde in natürlichem Zustand oder nach partieller Sterilisation bei Zugabe verschiedener Mengen Pepton. K. L. st. = Kontrolle Löblehm steril, K. L. u. = Kontrolle Löblehm unsteril, K. K. st. = Kontrolle Komposterde steril, K. K. u. = Kontrolle Komposterde unsteril.

deutlich, bis sie schließlich ab 1% das Wachstum völlig ausgeschaltet haben. Ganz offensichtlich wird hier das Wachstum des Pilzes durch Bildung antibiotischer Stoffe seitens zufällig in den Sand geratener Mikroben verhindert. Ganz ähnliche Verhältnisse finden wir im natürlichen Löblehm: günstige oder keine Wirkung gegenüber den Kontrollen bis 0,25%, dann zunehmende Hemmung. An diesem Verhalten ändert auch eine partielle Sterilisation nichts. Ganz anders ist die Reaktion des Pilzes in der Komposterde: Bei 0,1 und 1,5% Steigerung des Wachstums auf 2 bzw. 2,5 mm (gegenüber 1,0—1,7 mm in der Kontrolle) und bei den übrigen Konzentrationen Wirkungslosigkeit. Völlig abweichende Verhältnisse treten wiederum in partiell sterilisierter Komposterde



zutage: Hemmung gegenüber der Kontrolle bei der geringsten Konzentration, weitgehende Wirkungslosigkeit bei 0,1—1,5% und eine Steigerung des Pilzwachstums auf fast 8 mm bei 2%.

Ganz offensichtlich wird die reine Nährstoffwirkung im Boden überlagert durch die Tätigkeit anderer Mikroorganismen. Sie üben aber ihren Einfluß nicht in Form einer Nährstoffkonkurrenz aus. Dann müßten steigende Nährstoffgaben zunehmende Entwicklung auslösen, da der auf *Ophiobolus* entfallende Anteil sich erhöht. Das ist offensichtlich — abgesehen von 2% Pepton in partiell sterilisiertem Kompost — nicht der Fall. In dem partiell sterilisierten Kompost müßte bei Annahme einer Nährstoffkonkurrenz das Wachstum in 2% Pepton weit unter den in natürlicher Komposterde aufgefundenen Werten mit gleichem Peptongehalt liegen, da partielle Sterilisation schon nach 3—4 Tagen zu einer überaus starken Erhöhung der Mikrobenzahl bis zum Vielfachen der Werte in unbehandeltem Boden führt. Entscheidend ist also nicht das quantitative sondern das qualitative Moment. Das wird unterstrichen durch die Wirkung von 2% Pepton in partiell sterilisiertem Kompost, in dem durch die Nährstoffzugabe der hemmende Effekt der Bodenorganismen beseitigt wird, allerdings erst nach Umgestaltung der Bodenflora durch partielle Sterilisation.

Schon in früheren Arbeiten (WINTER 1942, 1948) wurden in der Bodenlösung Hemmungsstoffe nachgewiesen, deren Wirkung durch Auslaugen des Bodens mit Wasser vermindert werden kann. Sie sind vor allen Dingen die Ursache für die schwache Entwicklung des Pilzes in natürlichem Boden. Ihre Zerstörung (WINTER 1942) erklärt die Steigerung der Entwicklung nach der partiellen Sterilisation (siehe die Kontrollwerte in natürlichem und partiell sterilisiertem Boden). Auch diese und alle folgenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß nicht oder kaum Nährstoffmangel der entscheidende Faktor für die schlechte Entwicklung des Pilzes in natürlichen Böden ist. Insbesondere ist zu berücksichtigen, daß ein Wachstum von 5—8 mm, wie es in dem Peptonversuch maximal auftritt, lediglich aus dem Nährstoffvorrat der Plättchen erfolgen kann. Damit scheidet für ein Wachstum dieser Größenordnung der Nährstoffgehalt des Bodens ohnehin als unwesentlich aus.

Sicher kann durch Nährstoffzugabe, insbesondere bei negativem Ausgang des Experimentes, nicht ohne weiteres entschieden werden, ob ein Organismus durch Nährstoffmangel oder Hemmungsstoffe mikrobieller Natur an einer besseren Entwicklung im Boden gehindert wird. Es kann nämlich der tatsächliche Nährstoffmangel durch die gleichzeitig angeregte Vermehrung von Antagonisten überdeckt werden, wie das die Entwicklung in Sand und Lößlehm nach Peptonzugabe besonders deutlich erkennen läßt. Ebenso wenig kann man bei verbesserter Entwicklung nach Nährstoffzugabe ohne weiteres behaupten, daß vorher Nährstoff-

mangel der begrenzende Faktor gewesen wäre. Auch dieser Effekt kann auf einer Umsteuerung der Mikrobenentwicklung zu geringerer Hemmstoffbildung beruhen. Ob das eine oder das andere überwiegt, kann nur durch zusätzliche Experimente oder eine Vielzahl differenter Nährstoffzugaben entschieden werden. Wirken sich die untersuchten Nährstoffe verschiedenster Konzentration (trotz bekannter, günstiger Wirkung in Reinkultur) in der Regel kaum oder ungünstig aus, so darf man schließen, daß der Pilz gegen hemmende Einflüsse antibiotischer Natur außerordentlich empfindlich ist. Mit einiger Wahrscheinlichkeit wird also vor allem Toxinbildung, weniger aber Nährstoffmangel seine Entwicklung begrenzen.

Für die natürliche Komposterde und den Lößlehm kommt man nach Peptonzugabe zweifellos zu diesem Ergebnis. Besonders deutlich wird diese Wirkung der Bodenmikroben im reinen Quarzsand, wo die doch mehr zufällige Verun-

reinigung des Sandes mit Mikrobenkeimen bei höherer Konzentration zu einer jede Entwicklung verhindernden toxischen Wirkung führt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Wirkung des Peptons im Sand und in natürlichen Böden völlig andersartig, ja zumeist entgegengesetzt den Verhältnissen auf künstlichen Nährböden unter sterilen Bedingungen ist. Die Wirkung hängt insbesondere stark von der Bodenart ab, wobei die partielle Sterilisation einen „neuen Boden“ schafft. Die Wirkung der Nährstoffe auf *Ophiobolus graminis* wird vor allem durch ihren Einfluß auf die Entwicklung und Toxinbildung anderer Mikroben verursacht.

Diese Erscheinung drückt auch der Wirkung von Glykosegaben zu verschiedenen Böden ihren Stempel auf (Abb. 4, 7, 8). In Leitungswasser-, Kompost- und Lößlehmextraktagar geht das Wachstum bei steigender Glykosekonzentration stetig zurück. Im Sand zeigt sich ein deutliches Optimum bei 0,5% und darauf ein schroffer Abfall bis unter die Kontrollwerte. Auch hier kann nur die Toxinbildung diese Wachstumsdepression verursachen.

Sehr deutlich lassen auch Gartenerde und Komposterde im natürlichen und partiell sterilisierten Zustand erkennen, wie sehr die Bodenmikroben die Nährstoffwirkung überdecken.

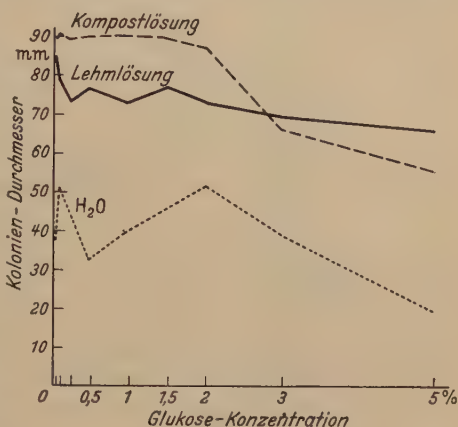


Abb. 7. Wachstum von *Ophiobolus graminis* in steriler Kultur auf Leitungswasser-Agar bzw. einem mit sterilem Lößlehm- oder Kompostextrakt angesetzten Agar nach Zugabe verschiedener Glykosekonzentrationen.

In dem natürlichen Löblehm und in der Komposterde sind Schwankungen in der Wuchsstärke zu beobachten, die in ihren Extremwerten als gesichert (man vergleiche die Schwankungen der drei Kontrollwerte) anzusprechen sind. In der Komposterde dürfte z. B. der Sprung von 0,3 mm auf 2,8 mm bei Erhöhung der Konzentration von 0,05 auf 0,5% und der Anstieg auf 2,5 mm bei 5% als gesichert angesehen werden,

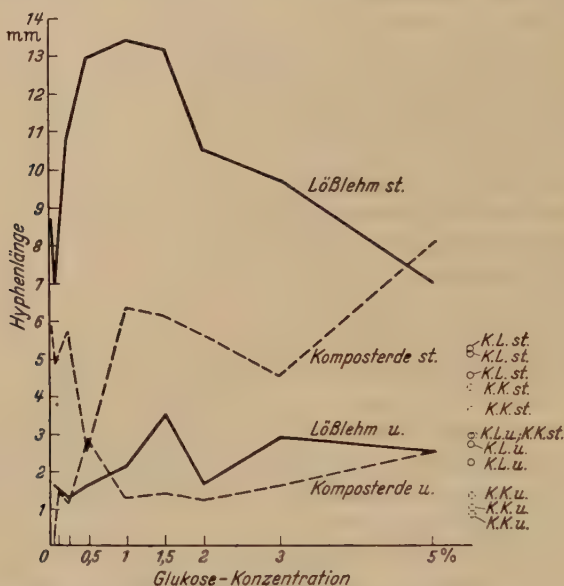


Abb. 8. Saprophytische Entwicklung von *Ophiobolus graminis* in Löblehm und Komposterde in natürlichem Zustand oder nach partieller Sterilisation bei Zugabe verschiedener Mengen Glykose. K. L. st. = Kontrolle Löblehm steril, K. L. u. = Kontrolle Löblehm unsteril, K. K. st. = Kontrolle Komposterde steril, K. K. u. = Kontrolle Komposterde unsteril.

ebenso in Löblehm die Differenz zwischen 1,3 mm (bei 0,25%), 3,5 mm (bei 1,5%) und 1,7 mm (bei 2%). Eine klare Abhängigkeit von der Nährstoffkonzentration fehlt, doch kann im ganzen eher von einem mit höherer Konzentration zunehmenden Wachstum gesprochen werden. Die Wirkung der Glykose ist also gegenüber sterilen Verhältnissen vollkommen abgewandelt.

Das gleiche gilt für die partiell sterilisierten Böden. Im Löblehm tritt eine ziemlich regelmäßige Kurve mit dem Optimum bei 1% in Erscheinung, deren Verlauf, wie ein Vergleich mit der Schwankungsbreite der Kontrolle klarstellt, weitgehend gesichert ist. Mit einer Nährstoffwirkung der Glycose muß hier gerechnet werden. In der partiell sterilisierten Komposterde zeigt die Abhängigkeit von der Nährstoffkonzentration ein völlig anderes Bild: eine durch tiefe Einbrüche gestörte, aber im



ganzen ansteigende Tendenz. Ein Vergleich beider Kurven veranschaulicht in besonders eindringlicher Weise den Einfluß der Mikrobentätigkeit auf die Nährstoffwirkung. Bei 0,5% Glykose liegt für die Komposterde das Minimum bei 2,5 mm, für den Lößlehm annähernd das Maximum bei 12,8 mm. Das Wachstum ist in dem Lößlehm also um 10,4 mm besser. Umgekehrt ist bei 5% die Entwicklung in der Komposterde stärker. Gleich auffällig ist das Zusammenfallen eines Minimums in der partiell sterilisierten Komposterde mit einem Maximum in natürlicher Komposterde.

Bei der Erklärung der Ergebnisse bei Biomalzzugabe

(Abb 4, 9, 10) muß berücksichtigt werden, daß das Wachstum in dem unsterilen Lößlehm (Kontrolle) wesentlich besser und die Schwankungsbreite

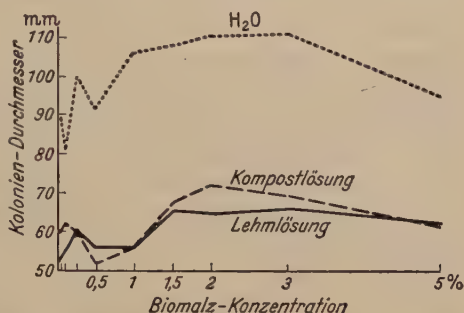


Abb. 9. Wachstum von *Ophiobolus graminis* in steriler Kultur auf Leitungswasser-Agar bzw. einem mit sterilem Lößlehm- oder Komposterde-Extrakt angesetzten Agar nach Zugabe verschiedener Biomalzkonzentrationen.

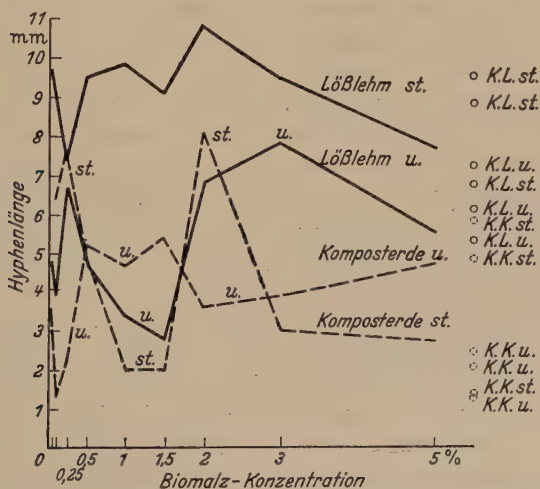


Abb. 10. Saprophytische Entwicklung von *Ophiobolus graminis* in Lößlehm und Komposterde in natürlichem Zustand oder nach partieller Sterilisation bei Zugabe verschiedener Mengen Biomalz. K. L. st. = Kontrolle Lößlehm steril, K. L. u. = Kontrolle Lößlehm unsteril, K. K. st. = Kontrolle Komposterde steril, K. K. u. = Kontrolle Komposterde unsteril.

der drei Kontrollwerte etwa doppelt so groß ist wie in den vorhergehenden Versuchen. Erheblich stärker sind die Differenzen der Kontrollwerte jedoch in partiell sterilisierten Böden. In der partiell sterilisierten

Komposterde und dem erhitzten Lößlehm sinkt ein Wert sogar um 4,0 bzw. 2,5 mm auf die gleiche Höhe wie in natürlicher Komposterde bzw. natürlichem Lößlehm ab. Das ist mit Rücksicht auf die sonst stets erzielte Einheitlichkeit der Resultate wahrscheinlich so zu erklären, daß in das durch die partielle Sterilisation erzeugte biologische Vakuum im Boden Infektionen aus dem Laboratorium einströmen und so in Einzelfällen zu außerordentlich starken Hemmungswirkungen gegenüber *Ophiobolus graminis* führen. Nach den Ergebnissen von KUBIENA und RENN (1934) darf man zwar damit rechnen, daß „Laboratoriums-keime“ auch nach Zugabe von organischen Stoffen keinen Einfluß auf die Ergebnisse haben. Das gilt jedoch nur für natürliche Böden, da partiell sterilisierte Substrate für Neuinfektionen viel günstigere Bedingungen bieten.

Reinkulturen von *Ophiobolus graminis* auf Leitungswasser-, Kompost- oder Lößlehmextraktagar zeigen ein Wachstumsoptimum bei 3% Biomalz und bei 5% eine schwache Abnahme gegenüber dem Optimalwert. Während also in dem gleichen Sand Glykose und insbesondere Pepton zur Entwicklung einer stark antagonistischen Bodenflora führten, fehlt bei Biomalz ein solcher die Nährstoffwirkung vollkommen verdeckender Einfluß der Mikroflora. Trotzdem sind antagonistische Kräfte auch hier, am Werke, wie die Verschiebung des Optimums auf 3% und das relativ sehr geringe Wachstum gegenüber der sterilen Biomalzkultur zeigt. Doch trägt die Erwartung, daß auch in anderen Böden (Abb. 9, 10) eine Ähnlichkeit mit der Wirkung in sterilen Kulturen zu beobachten wäre. War im Sandboden die qualitative Zusammensetzung der Mikroflora so einheitlich, daß ein stetiger Kurvenzug resultierte, so ergibt hier die Mannigfaltigkeit der in Mitleidenschaft gezogenen Bodenmikroben einen durch tiefe Einbrüche gestörten, nicht weiter analysierbaren Kurvenverlauf. Dabei könnte ein Teil der Störungen in den partiell sterilisierten Böden eventuell auf den gleichen Ursachen beruhen wie das Absinken einzelner Kontrollwerte in solcher Erde.

So gut wie alle Biomalzkonzentrationen erhöhen das Wachstum in der natürlichen Komposterde gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Durch 0,5%, 1% und 2% Biomalz steigt das Wachstum bis auf die Höhe der Werte in partiell sterilisierter Erde ohne Nährstoffgabe an. Es wird also durch Nährstoffzufuhr die hemmende Wirkung des Bodens weitgehend aufgehoben. In einem anderen Versuch mit natürlichem Lößlehm (vgl. Abb. 11b) fördern Maismehl und 0,5% Pepton besonders auffallend. Gleiches gilt für die Laufhyphenentwicklung in dem Lößlehm nach Zugabe von Glykose, Biomalz und Pepton in verschiedenen Konzentrationen (Abb. 11a). Man könnte also doch zu dem Schluß kommen, daß hier vor allem Nährstoffmangel die Entwicklung des Pilzes hemmt. Da aber ein Wachstum von 5—8 mm aus dem Nährstoffgehalt der

Plättchen heraus erfolgen kann, wird diese Steigerung wahrscheinlich auf einer Abschwächung der hemmenden Bodeneinflüsse durch Umsteuerung mikrobieller Gleichgewichte und physiologischer Prozesse beruhen.

Zusammenfassend können wir feststellen:

1. Nährstoffgaben zu natürlichen Böden und zu sterilen Kulturen zeitigen abweichende Ergebnisse. Sogar in einem nicht sterilen Quarzsand besteht schon eine völlig andere Abhängigkeit zwischen Nährstoffgehalt und Pilzwachstum wie in sterilem Substrat.

2. Der Verlauf der Kurven in unsterilem, reinem Sand zeigt zumeist noch regelmäßige Tendenz. In den natürlichen oder partiell sterilisierten Böden fehlt dagegen mit einer Ausnahme jede einfache und stetige Beziehung zwischen Nährstoffgabe und Wachstum.

Als Erklärung dieser Erscheinung können wir anführen:

1. Eine Nährstoffwirkung von Pepton, Biomalz und Glykose fehlt in natürlichen und partiell sterilisierten Böden zumeist ganz oder fast ganz, da sich die Entwicklung des Pilzes in der Regel in Grenzen hält, die lediglich durch Wachstum mit Hilfe des Nährstoffvorrats aus dem Impfstück erreicht werden können. Nur in Sand und zum Teil in Gartenerde mit Glykose ist das Wachstum des Pilzes so weitreichend und so dicht, daß mit einer unmittelbaren Nährstoffwirkung zu rechnen ist. Schwankungen in der Wachstumsintensität nach Nährstoffgaben werden also wohl vor allem durch Veränderungen der Bodenmikroflora und ihrer Einwirkung auf *Ophiobolus graminis* verursacht.

2. Schon aus der Tatsache, daß die zufällig in dem chemisch reinen Sand und Leitungswasser enthaltenen Keime überaus starke antibiotische Effekte auslösen können, geht hervor, daß es sich hierbei im wesentlichen nicht um wenige, spezifische, nur in bestimmten Böden vorkommende Arten handelt. Allerdings ist die Artenzahl der Antagonisten in Sand so gering, daß noch eine regelmäßige Abhängigkeit zwischen Nährstoffgehalt und Wachstum resultiert. Der sprunghafte Kurvenverlauf in den natürlichen Böden dürfte dagegen durch die Vielzahl der Bodenmikroben, die an der Wirkung auf *Ophiobolus graminis* beteiligt sind, bedingt sein.

#### D. Die Beeinflussung der parasitischen Phase von *Ophiopolus graminis* durch organische Nährstoffe.

Schon früher wurde nachgewiesen (WINTER 1942, 1947), daß antagonistische Einflüsse für die Laufhyphen und das saprophytische Mycel wachstumsbestimmend sind. Es dürfte aber der Antagonismus infolge der Sonderbedingungen in der Rhizosphäre in beiden Bereichen auf



verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Dringen nun die in freiem Boden wirksamen Einflüsse bis in die Rhizosphäre vor, oder herrscht in der wurzelnahen Zone ein „eigenes Klima“, das weitgehend gegen die Bodeneinflüsse abgeschirmt ist?

Einblick in diese Probleme mußte die Untersuchung des parasitischen und saprophytischen Wachstums durch identische Versuchsreihen geben. Es wurde daher in zwei Parallelversuchen unter völlig gleichen Bedin-

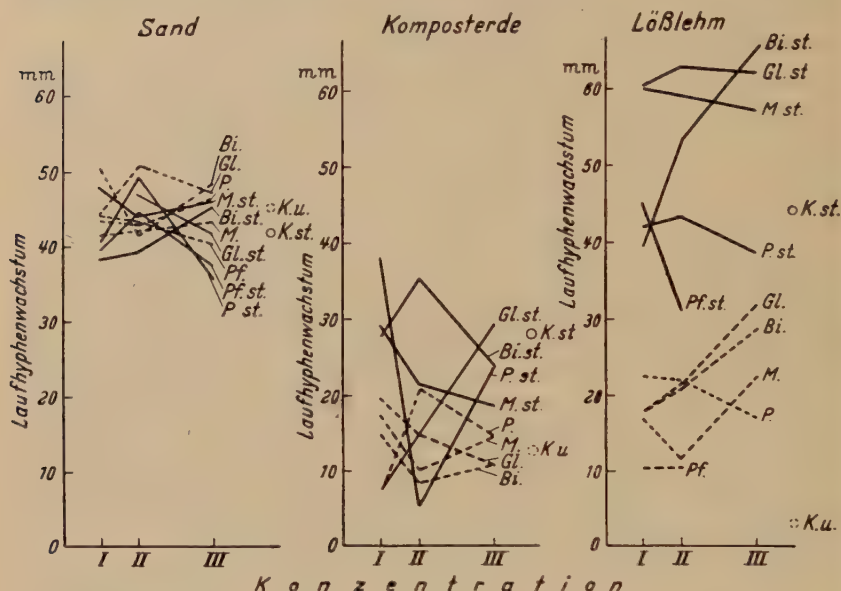


Abb. 11a. Entwicklung der Laufhyphen von *Ophiobolus graminis* in Sand, Komposterde und Lößlehm in natürlichem und partiell sterilisiertem Zustand bei Zugabe verschiedener Mengen von Biomalze (Konzentration I = 0,25%, II = 0,5%, III = 1%), Glykose (I = 0,25%, II = 0,5%, III = 1%), Pepton (I = 0,125%, II = 0,25%, III = 0,5%), Mais (I = 0,5%, II = 1%, III = 2%) und Pferdemist (I = 25% der Ausgangskonzentration, II = 50% der Ausgangskonzentration, III = 100% der Ausgangskonzentration). K. st. = Kontrolle steril, K. u. = Kontrolle unsteril.

gungen der Einfluß dreier verschiedener Konzentrationen von Witte-Pepton, Biomalze, Glykose, Maismehlaufschwemmung und Pferdemist-extrakt in einem durch lehmige Bestandteile leicht verunreinigten Flußsand, Lehm und Komposterde in partiell sterilisiertem und natürlichem Zustand untersucht (Abb. 11a und 11b).

2—4 mm Schwankung liegen nun bei dem starken Wachstum in der Rhizosphäre in der Fehlergrenze und besagen daher sehr wenig. Sie stellen aber für die saprophytische Entwicklung eventuell eine bedeutende Verdoppelung der Werte gegenüber der Kontrolle dar. Es kommt jedoch bei einem Vergleich der Wirksamkeit von Nährstoffgaben im Bereich der Rhizosphäre und im freien Boden nicht auf die absoluten

Schwankungen, sondern auf die im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ausgelösten relativen und fehlermäßig gesicherten Abweichungen an. Die Kurven für das saprophytische Wachstum wurden daher 5fach überhöht. Auf diese Weise wurden die Resultate in der Rhizosphäre und dem freien Boden unmittelbar vergleichbar, da wesentliche Unterschiede etwa gleich deutlich hervortraten.

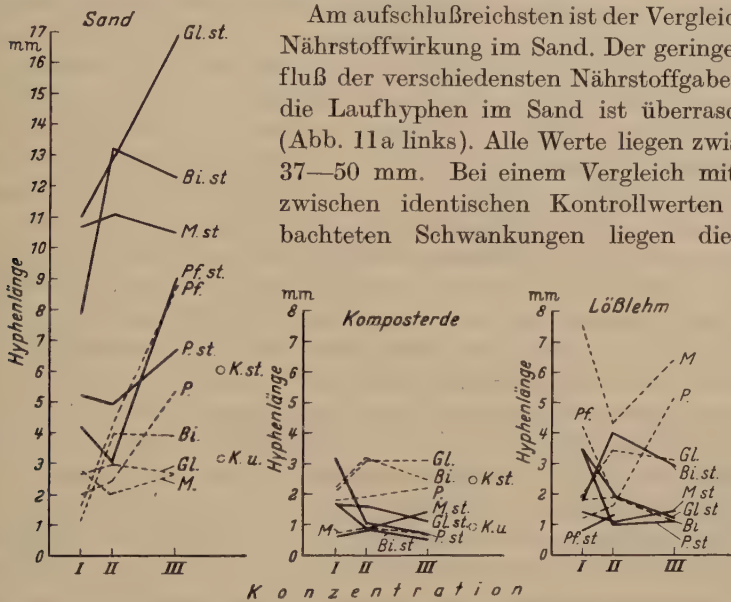


Abb. 11b. Saprophytische Entwicklung von *Ophiobolus graminis* auf Glasplatten in Sand, Komposterde und Lößlehm in natürlichem Zustand und nach partieller Sterilisation bei Zugabe von verschiedenen Mengen von Biomalz (Konzentration I = 0,25%, II = 0,5%, III = 1%), Glykose (I = 0,25%, II = 0,5%, III = 1%), Pepton (I = 0,125%, II = 0,25%, III = 0,5%), Mais (I = 0,5%, II = 1%, III = 2%) und Pferdemist (I = 25% der Ausgangskonzentration, II = 50% der Ausgangskonzentration, III = 100% der Ausgangskonzentration). K. st. = Kontrolle steril, K. u. = Kontrolle unsteril.

Nährstoffzufuhr ausgelösten Wachstumsänderungen kaum außerhalb der Fehlergrenze. Nur in wenigen Fällen ist eine stetig steigende oder fallende Tendenz zu beobachten, so daß insgesamt der Eindruck eines wesentlich durch Streuung bedingten Kurvenverlaufs entsteht. Gleichzeitig dürfte aber diese starke, nur hier beobachtete Bündelung aller Kurven als ein mittelbarer Beweis für die Zuverlässigkeit der Methodik gewertet werden.

Dagegen hängt das saprophytische Wachstum im Sand, wie wir schon aus früher aufgeführten Versuchen wissen, in zum Teil erstaunlicher Weise von dem Nährstoffgehalt ab (Abb. 11b links). Die Differenzen liegen weit außerhalb der Fehlergrenze, und in den Fällen deutlichster

Wirkung ist zumeist eine durchgehend fallende oder steigende Tendenz der Kurven zu sehen.

Die Rhizosphäre ist also im Sand gegen alle von außen kommenden Einflüsse so gut wie völlig abgeschirmt. Man könnte diese Erscheinung zunächst so zu erklären versuchen, daß die Nährstoffversorgung der Laufhyphen durch die in die Wurzel abzweigenden Infektionshyphen optimal ist und daher eine weitgehende Unabhängigkeit vom Nährstoffgehalt des Bodens bedingt, während gleichzeitig antagonistische Einflüsse in dem mikrokenarmen Sand unwesentlich sind. Dagegen sind die saprophytischen Mycelien in dem nahrungslosen Sand weitgehend von der Nährstoffzufuhr abhängig. Aber der hier auftretende starke Unterschied im saprophytischen Pilzwachstum in unbehandeltem und partiell sterilisiertem Sandboden (Abb. 11b) und die Tatsache, daß der an sich, also in steriler Kultur, stark fördernde Gehalt von 1% Biomalz bzw. 0,5% Pepton in nicht erhitztem Sand das Wachstum gegenüber den Kontrollen nicht ansteigen läßt, beweisen, daß auch in dem hier gebrauchten Sand nach Nährstoffzugaben starke antagonistische Effekte durch Entwicklung einer Bodenflora eintreten können. In dem chemisch reinen Sand (Abb. 4) der früher angeführten Versuche zeigte sich diese antagonistische Bodenflora in besonders deutlicher Weise.

Der Einwand, daß im Sand auch für die saprophytische Phase nach Nährstoffgaben kaum eine antagonistische Wirkung spürbar sei, da die Kontrollwerte kaum unterschritten werden, ist nicht stichhaltig. Unter sterilen Bedingungen würde nämlich nach Zugabe dieser Nährstoffe ein viel stärkeres Wachstum zu erwarten sein. Man muß daher schließen, daß diese antagonistischen Einflüsse nicht in die Rhizosphäre eindringen können bzw. dort neutralisiert werden.

Diese so grundsätzlichen Unterschiede zwischen Rhizosphäre und freiem Boden fehlen im Kompost und Lößlehm. Ein großzügiger Überblick (Abb. 11a u. 11b Mitte u. rechts) zeigt vielmehr in der Bündelung oder dem Auseinanderziehen der Kurven eine erhebliche Übereinstimmung — allerdings mit dem Unterschied, daß das Wachstum auf den Wurzeln etwa 5—10 mal so groß ist.

Deutlich, zum Teil in extrem scharfer Form, läßt sich erkennen, wie nunmehr nicht nur für die freien Mycelien sondern auch für die Laufhyphen der Nährstoffgehalt des Bodens mittelbar oder unmittelbar von ausschlaggebender Bedeutung wird. Es bedarf dabei nach dem früher Gesagten keiner weiteren Erörterungen, daß vor allem die Änderung des Hemmstoffgehaltes zu diesem Effekt führt. Insbesondere darf man für die nährstoffunabhängigen Laufhyphen annehmen, daß mittelbare mikrobielle Effekte ihr Wachstum bestimmen.

Wie erklärt sich nun aber, daß im Sand die antagonistische Wirkung oder die mikrobielle Tätigkeit in der Rhizosphäre überhaupt nicht



hervortritt? Diese Erscheinung könnte in Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Mikrobengehalt des Sandbodens und der beiden anderen Substrate stehen. Man könnte z. B. annehmen, daß sich von der geringen Anzahl der Bodenmikroben im Sand nur wenige Arten in der Rhizosphäre ansiedeln können, die überhaupt nicht, oder unter den dort herrschenden, vom übrigen Boden abweichenden Verhältnissen nicht antagonistisch wirksam sind. Dagegen fänden sich in der Vielzahl der Mikroben im Lößlehm bzw. Kompost stets viele Arten, die sich in der Rhizosphäre ansiedeln und dort bei Nährstoffzufuhr mittelbare Wirkungen gegenüber *Ophiobolus graminis* auslösen. Es bliebe dabei erstaunlich, daß im Sandboden keine Hemmungsstoffe in die Rhizosphäre hineingelangen, obwohl der ganze mit Nährlösung getränkte Sand Antibiotika in erheblicher Konzentration enthalten muß. Die Diffusion müßte sie rasch in die Rhizosphäre bringen. Und wie soll man dann erklären, daß die Rhizosphären-Mikroflora im Sand so zusammengesetzt ist, daß jeder im Boden nach verschiedenartigster Nährstoffgabe gebildete Hemmstoff umgewandelt oder irgendwie unschädlich gemacht wird?

Eine solche „Entgiftung“ in der Rhizosphäre scheint in der Tat möglich zu sein. Die Laufhyphen zeigen nämlich in Lößlehm und Kompost ein viel besseres Wachstum als freie Mycelien. Nun führt die Natur im Bereich der Rhizosphäre das Experiment durch, den Pilz aus der Wurzel optimal zu ernähren, ohne durch diese „sterile“ Nährstoffzufuhr die restliche Mikroflora zu beeinflussen. Da die Entwicklung des Pilzes in der Rhizosphäre erheblich besser ist als im freien Boden, könnten wir schließen, daß in der Erde neben dem Antagonismus auch der Nährstoffmangel begrenzender Faktor ist. Doch ist eine solche bessere Entwicklung in der Rhizosphäre von Weizenwurzeln auch dann zu beobachten, wenn *Ophiobolus* — wie es im Sand häufig zu erkennen ist — am Rand der Rhizosphäre, ohne Infektionshyphen abzuzweigen, wächst (WINTER 1942). Ebenso ist beim Eindringen in die Rhizosphäre nicht anfälliger Pflanzen (WINTER 1948) häufig eine ganz auffällige Entwicklungssteigerung zu beobachten, die unter gleichen Bedingungen durch Nährstoffgaben nicht zu erzielen ist. Es deutet das auf Sonderbedingungen in der Rhizosphäre, die zu einer Entgiftung des Bodens oder einer physiologischen Umstimmung des Pilzes führen. Auch die Unfähigkeit des Pilzes, sich unter natürlichen Verhältnissen aus der Rhizosphäre zu entfernen, läßt auf ein Reizgefälle zwischen Boden und Rhizosphäre schließen.

Es herrschen also in der Rhizosphäre Sonderbedingungen bezüglich der antibiotischen Verhältnisse und damit hinsichtlich der Mikroflora, über deren Natur wir noch keine nähere Auskunft geben können. Diese Beobachtung ist besonders interessant, da EATON und RIGLER (1946)

festgestellt haben, daß die Rhizosphärenflora die Resistenz von *Mais*, in natürlichem Boden gegenüber *Phymatotrichum omnivorum* bedingt. Wird *Mais* unter vollkommen sterilen Bedingungen im Sand aufgezogen, so wird die sonst resistente Pflanze von *Phymatotrichum* befallen. Die Rhizosphärenflora hat also hinsichtlich ihrer antibiotischen Wirkung einen besonderen, artgebundenen Charakter. Da die Resistenz von *Mais*, und das ist die interessanteste Folgerung, die EATON und RIGLER nicht gezogen haben, auf allen natürlichen Böden in Erscheinung tritt, muß man wohl eine erhebliche, von der Bodenart nicht berührte Konstanz in dem Artenbestand der Rhizosphäre annehmen. Es liegt bei der außerordentlichen Empfindlichkeit von *Ophiobolus graminis* gegenüber antibiotischen Wirkungen nahe, die unterschiedliche Resistenz verschiedener Arten gegenüber diesem Pilz mit der Zusammensetzung der Rhizosphärenflora in Verbindung zu bringen. Auch eine nähere Analyse der Nährstoffwirkung in Gartenerde oder Kompost zeigt uns, daß erhebliche Unterschiede in der Auswirkung von Nährstoffgaben im freien Boden und in der Rhizosphäre bestehen. Dabei soll nicht auf einzelne feine Unterschiede im Kurvenverlauf eingegangen werden, da diese innerhalb der Fehlergrenze liegen können. Nur gesicherte Differenzen mögen angeführt werden. Im partiell sterilisierten Kompost ist das saprophytische Wachstum bei allen Biomalkonzentrationen schlechter oder nicht besser als in natürlichem Kompost, das Wachstum der Laufhyphen dagegen zumeist eindeutig besser. Noch stärkere, weit außerhalb jeder Fehlermöglichkeit stehende Differenzen zeigt die Wirkung von Maismehl in Gartenerde. Das saprophytische Wachstum ist bei sämtlichen Maismehlkonzentrationen optimal im natürlichen, sehr schlecht dagegen im partiell sterilisierten Lößlehm; die parasitische Entwicklung ist dagegen maximal im partiell sterilisierten und extrem schwach im natürlichen Boden. Ähnliche starke Unterschiede bestehen zwischen der Wirkung von Biomalz in Lößlehm und Glykose in Komposterde auf die saprophytische Entwicklung und das Laufhyphenwachstum usw.

Sicher ist für die partiell sterilisierten Böden zu berücksichtigen, daß Laboratoriumsinfektionen eingreifen können. Doch ist in den hier genannten Fällen bei allen Konzentrationen der Unterschied zwischen Rhizosphäre und freiem Boden so eindeutig vorhanden, daß die Interferenz solcher zufälliger Infektionen sehr unwahrscheinlich ist. Zudem erkennt man, daß die Nährstoffwirkung für die Rhizosphäre und den freien Boden in den natürlichen Erden, in denen solche Fehler auscheiden (siehe oben), gleichfalls zumeist völlig abweichend, ja invers ist.

Ein Vergleich der Nährstoffwirkung auf die saprophytische Phase in diesen und vorangegangenen Versuchen mit dem Ziel, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu kontrollieren, erscheint abwegig, da die Böden nicht der gleichen Herkunft waren.

Zusammenfassend ergibt sich also, daß zwischen der Rhizosphäre und dem freien Boden erhebliche Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener Nährstoffgaben bestehen. Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß alle Ergebnisse sich in keiner Weise der Theorie von GARRETT (1936) einordnen lassen, nach der der  $\text{CO}_2$ -Gehalt des Bodens der entscheidende Faktor für die Laufhyphenentwicklung sein soll.

### E. Nährstoffgehalt und Epidemiologie der Ophiobolose.

Voraussagen über die Auswirkung leicht zersetzlicher Nährstoffgaben für die saprophytische und parasitische Phase sind also kaum zu machen. Eine Gabe in bestimmter Höhe mag hemmen, eine andere geringere oder höhere Dosis oder dieselbe Gabe in anderer Zubereitung kann deutlich entwicklungssteigernd wirken. So beobachtete WINTER (1942), daß eine Beimischung von 5% grob geschnittener *Vicia faba* zu humusreichem Sandgemisch das Wachstum der Laufhyphen von 35,8 (Kontrolle) auf 23,9, bei 10% auf 2,2 mm, bei Zugaben breiig gequetschter *Vicia* auf 3,2 mm (5%) bzw. 18,7 mm (10%) absinken läßt. Für beide Lebensabschnitte kann ferner durch Nährstoffgaben zum natürlichen Boden die Entwicklung nicht selten so erheblich gesteigert werden (vgl. unsterile Komposterde in Abb. 10, unsteriler Lehm in Abb. 11a und 11b), daß der Pilz nunmehr in dem sonst vor jeder Infektion schützenden Humus oder dem gleichsinnig wirkenden Lößlehm gleich stark wächst bzw. infiziert wie im Sand oder der durch partielle Sterilisation ihrer infektionshemmenden Eigenschaften beraubten Komposterde oder Lößlehm. Jedenfalls ist nach Zufuhr organischer Stoffe durchaus nicht immer eine Hemmung des Pilzes zu erwarten, wie man das in Verallgemeinerung positiver Ergebnisse bei antibiotisch empfindlichen Organismen nur zu leicht erwarten könnte (vgl. für Kartoffelschorf: SANFORD 1926, Flachswelke: BOLLEY und MANNS 1932, cotton-root-rot: KING und EATON 1934a, 1934b).

In den vorliegenden Versuchen wurden allerdings zum Teil relativ hohe Dosen leicht zersetzlicher Verbindungen in den Boden eingebracht und insofern wurde von den in der Natur gegebenen Verhältnissen abgewichen. Es kam aber zunächst einmal darauf an, das biologische Gleichgewicht durch kräftige Stöße zu verschieben, um im Experiment möglichst deutliche Antworten zu erhalten. Zudem lehrte schon der Versuch mit *Vicia faba*, daß auch mildere Eingriffe, wie wir sie im Gefolge von Kulturmaßnahmen erwarten können, deutliche und zum Teil umkehrbare Entwicklungsänderungen auslösen können. Sicherlich aber bedarf der Effekt normaler Düngungsmaßnahmen weiterer Untersuchungen.

Wir müssen weiterhin in Rechnung stellen, daß die Zersetzung des durch *Ophiobolus* befallenen Pflanzengewebes von Nährstoffen zum Teil



in ganz anderer Weise beeinflußt wird. So beschleunigen nach GARRETT (1938) Glykose, Stärke, rye-grass-meal in verschiedenen Konzentrationen in jedem Fall die Zersetzung des Mycels in dem Pflanzengewebe, während für die Mycelneubildung eine gleichsinnige, also hemmende Wirkung durchaus nicht immer zu erwarten ist. Die Zersetzung des verseuchten Pflanzengewebes wird aber zumeist ebenso wichtig, ja häufig von größerer Bedeutung als die saprophytische Neubildung von Mycel sein. Namentlich, wenn anfällige Pflanzen rasch hintereinander angebaut werden, wird die Mycelzersetzung der entscheidende Faktor, da die verseuchten Pflanzenreste unmittelbar nach dem Anbau von Wirtspflanzen die Masse des Infektionsmaterials stellen werden. Bei vieljährigem Abstand zwischen dem Anbau von Weizen wird dagegen die saprophytische Neubildung von Mycel häufig ausschließlich den Fortbestand der Bodenverseuchung sichern müssen.

Ferner erschwert die Prognose der Verseuchung, daß nach eigenen (vgl. WINTER 1948) großenteils unveröffentlichten Ergebnissen die Entwicklung des Pilzes in der Rhizosphäre nicht anfälliger Pflanzen gegenüber dem „freien“ Boden gesteigert ist. Es kommt gleichsam zur Bildung einer peritrophen Mykorrhiza (JAHN 1934). Von diesem Gesichtspunkt aus ist das von MÜLLER-KÖGLER (1938) beobachtete mehr oder minder starke Eindringen in verschiedene Pflanzen, ohne daß es zu Krankheitssymptomen kommt, ein Übergang von der peritrophen zur endotrophen Mykorrhiza. Eine solche Abstufung von lockerem Zusammenleben bis zur endotrophen Mykorrhiza bildet z. B. die Reihe *Ranunculus repens*, *Fagopyrum esculentum*, *Urtica urens*, *Linum usitatissimum*.

Wir müssen bei der Erklärung des Massenwechsels von *Ophiobolus graminis* weiter in Betracht ziehen, daß Ursachen unbekannter Art dazu führen können, daß die Entwicklung des Pilzes plötzlich erheblich emporschnellt. Wenn diese Änderung nach den in der Abb. 1 zusammengefaßten Ergebnissen auch nur eine Steigerung des Wachstums von 0,5—1,0 mm auf 2—3 mm, also um 1—2 mm verursacht, so sind diese Wirkungen doch prozentual mit 200—400%, ja, wenn man die Dichte des Mycels berücksichtigt, noch höher anzusetzen. Hinzu kommt, daß nach bisherigen, noch nicht systematisch unterbauten Beobachtungen (siehe das Wachstum der Kontrolle in natürlicher Gartenerde (Abb. 10) mit 5,2—7,2 mm) diese Sprünge u. a. zu erheblich stärkerem Wachstum führen können.

Man könnte geneigt sein, solchen Einflüssen eine beherrschende Rolle für den Massenwechsel des Pilzes zuzuschreiben. Immer wieder treten in einem größeren Gebiet über die verschiedensten Bodentypen und Fruchtfolgen hinweg Jahre mit schweren *Ophiobolus*-Schäden und Jahre auf, in denen es schwer hält, einzelne weißährige Pflanzen zu finden.

Es schieben sich hier also anscheinend über Kulturmaßnahmen und Bodentypen Faktoren von allgemeiner und durchschlagender Bedeutung in den Vordergrund. In der Tat wird z. B. die Wirkung von Temperatur und Feuchtigkeit wenig durch den Bodentyp und das übrige Milieu beeinflußt. Das gilt für die parasitische Phase (WINTER 1940) und nicht minder für die saprophytische Entwicklung, die nach eigenen unveröffentlichten Untersuchungen unabhängig vom Bodentyp bei einer Bodenfeuchtigkeit von 80—90% der m. W. K. optimal verläuft. Trotzdem darf die Bedeutung solcher Faktoren für die Verbreitung des Pilzes im Boden nicht überschätzt werden. Weißährigkeit tritt z. B. insbesondere dann auf, wenn nach Zersetzung der obersten Teile des Halmes und der Kronenwurzeln infolge hoher Bodenfeuchtigkeit in der obersten Ackerkrume und hoher relativer Feuchtigkeit in der bodennahen Luftschicht und nach kräftigen Niederschlägen im Laufe des Frühsommers die keine stärkeren Anspannungen im Wasserhaushalt gewohnten Pflanzen von großer Dürre getroffen werden. Bei gleicher Bodenverseuchung und gleichem Befall der tieferen Wurzelteile, aber geringerer Feuchtigkeit in der obersten Bodenkrume zu diesem Zeitpunkt wird diese Form der Krankheit, die von uns in der Regel allein erkannt und in der Epidemiologie berücksichtigt wird, zumeist ausbleiben. Bodenverseuchung, Infektionsstärke und Schadauftreten sind eben getrennte und durchaus nicht immer parallel laufende Erscheinungen.

Im Freiland kommt eine weitere Komplikation hinzu. In allen Versuchen wurde die Erde ganz locker gekrümelt gehalten, so daß namentlich mit Rücksicht auf die geringe Höhe der Erdschicht über der Glasplatte (2 cm) für den Pilz eine optimale Durchlüftung sichergestellt war. Damit waren Schwankungen in der  $\text{CO}_2$ -Konzentration, die im Gefolge der Nährstoffgaben zu erwarten sind, für den überaus  $\text{CO}_2$ -empfindlichen Pilz ausgeschaltet. Die zumeist sehr unterschiedliche und im ganzen sehr dichte Bodenstruktur im Freiland wird aber bewirken, daß der Erfolg organischer Nährstoffzufuhr in nicht unbeträchtlichem Ausmaß von der Kohlendioxydanhäufung im Boden bestimmt wird.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben also in praktischer Hinsicht zum Teil wenig erfreuliche Konsequenzen. Das Geschehen im Boden erweist sich also so komplex, daß selbst bei gut untersuchten Böden Prognosen über die Wirkung organischer Stoffe nicht gestellt werden können. Auch jede Verallgemeinerung der Ergebnisse, selbst für geringfügig abweichende Verhältnisse ist unmöglich, so daß an eine generelle Lösung dieser Probleme nicht zu denken ist. Es ist zu vermuten, daß auch die Zufuhr anorganischer Salze, wie sie im Zuge der künstlichen Düngung zur Anwendung kommt, gleich unübersichtliche Wirkungen zeitigt.

### Zusammenfassung.

1. Die von WINTER (1947) angegebene Methode zur quantitativen Messung des Pilzwachstums in natürlichen Böden wird auf ihre Zuverlässigkeit überprüft. Die Streuung der Werte ist in natürlichen Böden gering, doch treten bei Wiederholung in allen Bedingungen identischer Versuche in Abständen von 14 Tagen in Lößlehm und Kompost zu verschiedenen Zeiten Sprünge zu kräftigerer Entwicklung auf. Ein Zusammenhang mit Witterungseinflüssen unbekannter Natur (BORTELS) wird vermutet.

2. Der auf sterilen Nährböden beobachtete gesetzmäßige Zusammenhang zwischen Nährstoffgehalt (Pepton, Glykose, Biomalz in Konzentrationen von 0,05—5%) und Pilzwachstum wird schon in reinem, nicht sterilem Sand vor allem durch antibiotische Einflüsse in einer allerdings noch übersichtlichen Weise verändert. Die Umformung steigert sich in Kompost und Lößlehm durch Verstärkung oder Abschwächung antibiotischer Prozesse bis zu unstetigem, sprunghaftem Kurvenverlauf.

3. Vergleichende Untersuchungen zwischen der Nährstoffwirkung in der Rhizosphäre und im freien Boden zeigen, daß die Rhizosphäre im Sand gegen Einflüsse aus dem Boden weitgehend abgeschirmt ist. Nährstoffgaben lassen auch in Kompost und Lößlehm innerhalb der Rhizosphäre zum Teil die umgekehrte Wirkung erkennen.

Besonderen Dank schulde ich Fräulein HILDEGARD SCHNEIDERS für ihre sorgfältige und aufopfernde Mitarbeit bei diesen Untersuchungen.

### Literatur.

ADAM, D. B., and T. T. COLQUHOUN: The spread of take-all through the soil. J. Austr. Inst. agric. Sci., Sydney, **2**, 172—174 (1936).

BLAIR, I. D.: Behaviour of the fungus *Rhizoctonia solani* Kühn in the soil. Ann. appl. Biol., London, **30**, 118—127 (1943). — BOLLEY, H. L., and T. F. MANNS: Fungi of flax seed and flax-sick soil. Bull. N. Dak. agric. Exp. Sta., Fargo, 259 (1932). — BORTELS, H.: Meteorobiologische Untersuchungen an *Azotobacter*. Zbl. Bakteriologie, Abt. II, **102**, 129—153 (1940); Über Beziehungen zwischen epidemiologischem und meteorologischem Geschehen, unter besonderer experimenteller Berücksichtigung der Inhibinwirkung. Zbl. Bakteriologie, Abt. II, **104**, 289—325.

EATON, F. M., and N. E. RIGLER: Influence of carbohydrate levels and root-surface microfloras on *Phymatotrichum* root rot in cotton and maize plants. J. agric. Res., Washington, **72**, 137—161 (1946).

FELLOWS, H.: Effect of certain environmental conditions on the prevalence of *Ophiobolus graminis* in the soil. J. agric. Res., Washington, **63**, 715—726 (1941). — FELLOWS, H., and C. H. FICKE: Soil infestation by *Ophiobolus graminis* and its spread. J. agric. Res., Washington, **58**, 505—519 (1939).

GARRETT, S. D.: Soil conditions and the take-all disease of wheat. Ann. appl. Biol., London, **23**, 667 (1936); Soil conditions and the take-all disease of wheat. II. The reaction between soil reaction and soil aeration. Ann. appl. Biol., London, **24**, 747 (1937); Soil conditions and the take-all disease of wheat. III. Decomposition of the resting mycelium of *Ophiobolus graminis* in infected wheat stubble buried in the soil. Ann. appl. Biol., London, **25**, 742—766 (1938); Soil conditions and the take-all disease of wheat. V. Further experiments on the survival of *Ophiobolus*



*graminis* in infected wheat stubble buried in the soil. Ann. appl. Biol., London, **27**, 199—204 (1940); Soil conditions and the take-all disease of wheat. VII. Survival of *Ophiobolus graminis* on the roots of different grasses. Ann. appl. Biol., London, **28**, 325—332 (1941); The take-all disease of cereals. Imperial bureau of soil science. Technical communication No. 41, 1942; Soil conditions and the take-all disease of wheat. VIII. Further experiments on the survival of *Ophiobolus graminis* in infected wheat stubble. Ann. appl. Biol., London, **31**, 186—191 (1944); Root disease fungi. Annales Cryptogamici et Phytopathologici, Vol. I., Waltham, USA, 1944.

JAHN, E.: Die peritrophe Mykorrhiza. Ber. deutsch. bot. Ges. **52**, 463—474 (1934).

KING, C. J.: A method for the control of cotton root rot in the irrigated southwest. Circ. U. S. Dep. Agric., Washington, 425 (1937). — KING, C. J., and E. D. EATON: Some microbiological activities affected in manurial control of cotton root rot. J. agric. Res., Washington, **49**, 1093—1107 (1934); Further observations on the natural distribution of the cotton root rot fungus. Phytopathology, Lancaster, Pa., **24**, 551—553 (1934). — KUBIENA, W., and CH. E. RENN: Micro-pedological studies of the influence of different organic compounds upon the microflora of the soil. Zbl. Bakteriell., Abt. II, **91**, 267—292 (1934).

LIESAU, O. F.: Zur Biologie von *Didymella lycopersici*, dem Erreger der Tomatenkrebskrankheit. Phytopathol. Z. **5**, 1—40 (1932).

MÜLLER, K. O.: Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Biologie von *Hypochnus solani* P. u. D. (*Rhizoctonia solani* K.). Arb. Biol. Reichsanst., Berlin, **13**, 197—262 (1924). — MÜLLER-KÖGLER, E.: Untersuchungen über die Schwarzbeinigkeit des Getreides und den Wirtspflanzenkreis ihres Erregers. Arb. Biol. Reichsanst., Berlin, **22**, 271—319 (1938).

NIETHAMMER, A.: Die mikroskopischen Bodenpilze. Gravenhage 1937.

PADWICK, G. W.: Influence of wild and cultivated plants on the multiplication, survival and spread of cereal foot-rotting fungi in the soil. Canad. J. Res., Ottawa, **12**, 575—589 (1935).

REA, H. E.: The effect of tillage on eradication of cotton root rot. J. Amer. Soc. Agron., **25**, 764—771 (1933); The control of cotton root rot in the Blackland region of Texas. Bull. Tex. agric. Exp. Sta., Texas, 573 (1939). — RUSSEL, R. C.: Studies of take-all and its causal organism *Ophiobolus graminis*. Dom. of Canada, Dep. of Agric. Bull. Nr. 170, New Series, Ottawa, 1934.

SANFORD, G. B.: Some factors affecting the pathogenicity of Actinomyces scabies. Phytopathology, Lancaster, Pa., **16**, 525—547 (1926). — SCHAFFNIT, E., u. K. MEYER-HERMANN: Beiträge zur Kenntnis der Wechselbeziehungen zwischen Kulturpflanzen, ihren Parasiten und der Umwelt (3. Mitteilung). Über den Einfluß der Bodenreaktion auf die Lebensweise von Pilzparasiten und das Verhalten ihrer Wirtspflanzen. Phytopathol. Z. **2**, 99—166 (1930).

WAKSMAN, S. A., and R. L. STARKEY: Influence of organic matter upon development of fungi, actinomycetes and bacteria in soil. Soil Sci., Baltimore, Md., **17**, 373 (1924). — WINTER, G.: Der Einfluß der physikalischen Bodenstruktur auf den Infektionsverlauf bei der Ophiobolose des Weizens. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz **49**, 513—559 (1939); Die Infektion des Weizens durch *Ophiobolus graminis* als Funktion der Bodenfeuchtigkeit. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz **50**, 326—356 (1940); Der Einfluß partieller Sterilisation des Bodens auf die Entwicklung der Laufhyphen von *Ophiobolus graminis*. Phytopathol. Z. **14**, 204—302 (1942); Eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Wachstums parasitischer oder saprophytischer Pilze im natürlichen Boden. Festschrift Appel, Biol. Zentralanst., Berlin, 12—15 (1947); Untersuchungen über die Beziehungen zwischen *Ophiobolus graminis* und anderen Organismen mit Hilfe der Aufwuchsplattenmethode. Arch. Mikrobiol. **14**, 240—270 (1949).

(Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn.)

## Die Mikroflora der Rhizosphäre als resistenzbestimmender Faktor.

Von

A. GERHARD WINTER und ROSMARIE VON RÜMKER.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. April 1949<sup>1</sup>.)

STILLE (1938) gelang es, bei Impfung steriler Sandkulturen von Senf mit Reinkulturen bestimmter Mikroorganismen einschließlich *Hefen* in jedem Falle eine Übervermehrung innerhalb der Rhizosphäre mit einer von RIPPEL (1936) inaugurierten Methode nachzuweisen. Das spricht gegen eine spezifische Zusammensetzung der Rhizosphärenflora, wie sie von ISAKOWA und SMIRNOWA (1937) behauptet wurde. Doch abgesehen davon, daß STILLE wesentliche Befunde dieser Autoren nicht bestätigen konnte, ist zu bedenken, daß die in Reinkulturen fehlende Spezifität bei Verwendung von Mischkulturen durch Verdrängung der sich weniger gut in der Rhizosphäre entwickelnden Mikroben durch besser angepaßte Formen herbeigeführt werden könnte. So hat TIMONIN (1940) charakteristische Besonderheiten und Unterschiede in der Rhizosphärenpopulation verschiedener Sorten von Flachs und Tabak festgestellt, die nach seinen Beobachtungen trotz mancher Schwankungen in Einzelheiten des Mikrobenbestandes selbst bei sehr unterschiedlicher Düngung in großen Zügen erhalten blieben. Allerdings haben EATON und RIGLER (1946) ähnliche Unterschiede in der Rhizosphärenflora durch verschiedene Ernährung oder Verstümmelung junger Baumwollpflanzen erreichen können, wie sie TIMONIN zwischen verschiedenen Flachs- und Tabaksorten beobachtete (vgl. dazu allerdings unten).

Nun könnte die Eigenart der Rhizosphäre auch über die Resistenz einer Pflanze gegenüber einem Parasiten entscheiden, sei es, daß art-spezifische Stoffe oder eine typische, durch die Wurzelausscheidungen herbeigeführte Zusammensetzung der Rhizosphärenflora den Parasiten hemmen oder fördern. Antibiotische Einflüsse sind für die Entwicklung bodenbewohnender Mikroben häufig von besonderer Bedeutung (vgl. WINTER 1942, 1948). Der Parasit kann aber nur nach Durchwachsen der mikrobe-reichen und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit häufig besonders stark antibiotisch wirksamen Rhizosphäre die Wurzel infizieren. Zudem sind lokale Wurzelinfektionen zumeist harmloser Natur. Ein wirklich schädigender Befall muß häufig mit einer erheblichen Ausdehnung der Infektion längs der Wurzel verbunden sein, weil ein für die Auswirkung der Infektion erforderlicher Gehalt der Wurzel an toxischen, welkeauslösenden Stoffen erreicht werden muß, oder ein Vor-

<sup>1</sup> Von der Redaktion der „Botanica oeconomica“ im August 1948 angenommen; die Zeitschrift hat jedoch ihr Erscheinen einstellen müssen.

dringen bis zur Stengelbasis und zentrale Abschnürung des Wurzelsystems Vorbedingung für das Auftreten von Krankheitssymptomen ist.

WINTER hat 1942 (S. 244) nachgewiesen, daß innerhalb der Rhizosphäre des Weizens Wurzelausscheidungen Sonderbedingungen schaffen, die dem Wurzelparasiten *Ophiobolus graminis* ein besseres Wachstum als im „freien Boden“ ermöglichen. Der begrenzende Faktor für die Entwicklung dieses Pilzes im Boden ist nun in antibiotischen Einflüssen zu suchen (WINTER). Es müssen daher in der Rhizosphäre Sonderbedingungen herrschen, welche die antibiotische Wirkung gegenüber dem Boden verringern. Das muß überraschen, da nach den Untersuchungen von GARRETT (1934) eine positive Korrelation zwischen Mikrobenzahl und Wachstumshemmung von *Ophiobolus graminis* besteht und die Keimzahl in der Rhizosphäre stark erhöht ist. Da diese bessere Entwicklung in Wurzelnähe in den verschiedenartigsten Böden auftritt (WINTER 1948), liegt die Vermutung nahe, daß Wurzelexkrete eine physiologische Umstimmung des Parasiten herbeiführen.

WINTER (1949) untersuchte daher die Wirkung organischer Stoffe (Biomalz, Pepton, Glykose, Maismehl in Konzentrationen von 0,05—5%) auf das Wachstum von *Ophiobolus graminis* in der Rhizosphäre und im freien Boden. Die Rhizosphäre erwies sich dabei im Sand gegen Einflüsse, die sich im Boden auf den Parasiten außerordentlich stark auswirkten, als weitgehend abgeschirmt. Ihr Sondercharakter wird hier also nach Zugabe verschiedenster Mengen organischer Nährstoffe stets gewahrt. Auch im Kompost und Lößlehm ließen Nährstoffzugaben innerhalb der Rhizosphäre zum Teil eine umgekehrte Wirkung wie im freien Boden erkennen. Diese Kontroverse ist in zwei Ursachen begründet: Die Wirkung der Nährstoffe auf *Ophiobolus graminis* wird vor allem durch gleichzeitige Verstärkung oder Abschwächung antibiotischer Erscheinungen bestimmt; die Unterschiede in der Mikroflora des Bodens und der Rhizosphäre bedingen daher völlig andersartige Wirkungen der Nährstoffe auf den Pilz.

Somit spricht alles für eine spezifische Wirkung der Rhizosphäre, ja sogar der Rhizosphärenflora auf diesen Parasiten. Und zwar besteht dieser Einfluß in einer Besserung der Wachstumsbedingungen des Pilzes gegenüber dem freien Boden, aber einer Hemmung des Pilzes gegenüber partiell oder ganz sterilen Bedingungen (WINTER 1942).

Diese Hemmung der Infektion und die Bedeutung der Rhizosphärenflora für die Resistenz der Pflanzen läßt sich besonders gut aus den Untersuchungen von MÜLLER-KÖGLER (1938) über den Wirtspflanzenkreis von *Ophiobolus graminis* erschen. Sie konnten von ihm allerdings noch nicht in dem hier ausgeführten Sinne interpretiert werden. MÜLLER-KÖGLER stellte bei der Untersuchung vieler monokotyl und dikotyl Pflanzen fest, daß die Mehrzahl durch den Pilz mehr oder minder stark infiziert wird. Das überrascht, da nach eigenen, sehr eingehenden Untersuchungen an vielen Unkräutern und Kulturpflanzen zwar auf sehr stark verseuchten Feldern das Mycel des Pilzes vereinzelt in der Rhizosphäre zu finden ist, ein Eindringen in die Wurzel aber niemals beobachtet wurde. Doch arbeitete MÜLLER-KÖGLER mit steriler Erde, während unsere Beobachtungen im Freiland oder im Gefäßversuch mit unsteriler Erde angestellt wurden. Unter „sterilen“ Bedingungen (spätere Nachinfektion war bei MÜLLER-KÖGLER infolge Verwendung offener Gefäße möglich) sind somit die im Freiland vorhandenen Unterschiede zwischen anfälligen und resistenten Pflanzen weitgehend verwischt. Die Rhizosphärenflora bestimmt also hier in erheblichem Ausmaß die Resistenz der Wirtspflanze gegenüber *Ophiobolus graminis*.



In einer Arbeit von EATON und RIGLER (1946), die uns infolge des Krieges erst im August 1948 zugänglich wurde, wird gleichfalls wahrscheinlich gemacht, daß die Resistenz von *Mais* gegenüber *Phymatotrichum omnivorum* durch die Rhizosphärenflora bedingt ist. Sterile Anzucht ermöglichte eine kräftige Infektion des normalerweise völlig resistenten Mais. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß infolge der Versuchsanordnung, die den Pilz vor Erreichen der Wurzel zum Durchwachsen mehr oder minder langer Abstände im Boden zwang, neben der Rhizosphärenflora auch die Mikroflora des Bodens auf dieses Ergebnis einigen Einfluß gehabt haben könnte.

Die Vermutung liegt also nahe, daß dieser Zusammenhang zwischen Resistenz im Feldanbau und Rhizosphärenflora nicht vereinzelt auftritt. Es wurde daher geprüft, ob bei anderen Parasiten gleiche Verhältnisse bestehen. *Ascochyta pinodella* infiziert im natürlichen Boden Erbsenwurzeln. Partielle Sterilisation des Bodens oder Infektion unter sterilen Bedingungen (siehe unten) hat auf die Infektionsstärke keinen wesentlichen Einfluß. Ausschaltung der Mikroben im Rhizosphärenbereich ist hier also bedeutungslos. Gleiches gilt nach EATON und RIGLER (1946) für die Infektion von Baumwolle durch *Phymatotrichum omnivorum*. Dagegen ist Weizen in natürlichem Boden völlig resistent gegen *Ascochyta pinodella*. Wird aber Weizen unter sterilen Kautelen (Entkeimung der Samen durch 0,1 % Sublimatlösung mit 15 % Alkohol) in Reagensgläsern auf einem Zinzadze-Agar [zu 1 l  $H_2O$  1 g  $NaNO_3$ ; 0,5 g  $MgSO_4$ ; 0,2 g  $Fe_2(SO_4)_3$ ; 0,5 g  $KHCO_3$ ; 0,7 g  $Ca_3(PO_4)_2$ ] gezogen und durch Aufbringen einer kleinen pilzdurchwachsenen Agarscheibe auf die Oberfläche des Agars mit *Ascochyta pinodella* infiziert, so überzieht der Pilz, der auf dem Zinzadzeagar an sich sehr schlecht gedeiht, zunächst die Oberfläche der in den Agar eindringenden Wurzel mit einem dichten, dunklen Geflecht von Hyphen, das in aufgelockerter Form bis an die Grenze der Rhizosphäre zu beobachten ist, und dringt schließlich in die Wurzelrinde ein (Abb. 1 u. 2). Die Wurzel Ausbildung ist gehemmt, vor allem die Zahl der Seitenwurzeln vermindert (Abb. 3). Es handelt sich also um ein Phänomen, das mit dem Erscheinungsbild einer ektotrophen Mycorrhiza große Ähnlichkeit hat (siehe unten). Bei Verwendung von Erdextrakt statt Leitungswasser zum Ansatz des Zinzadze-Agar wird die Wurzel viel schwächer mit dem Mycel durchsetzt, so daß die sonst beobachtete Bräunung der Gewebe ganz fehlt. Der Charakter dieses Zusammenlebens kann also durch Änderung des sterilen Nährsubstrates verändert werden. Ob dieser Effekt der Einwirkung auf Wirt oder Parasit zu danken ist, bleibt zunächst unentschieden. Die gleichen Ergebnisse wurden erhalten, sofern der gleiche Versuch in einem sterilen mit Zinzadze-Lösung getränkten Sand unter völlig sterilen Bedingungen durchgeführt wurde. Da die Infektionsstärke bei Erbsen durch die Gegenwart der Bodenmikroben nicht berührt wird, dürfte die gleichzeitige Ausschaltung der Mikroflora des Bodens außerhalb der Rhizosphäre für

das Eintreten der Infektion bedeutungslos sein. Überdies kamen die jungen Wurzeln durch Auflage der Samen auf Mycelteile unmittelbar mit dem Parasiten in Berührung, die Hyphen brauchten also nicht erst durch den Boden bis zur Rhizosphäre vorzudringen.

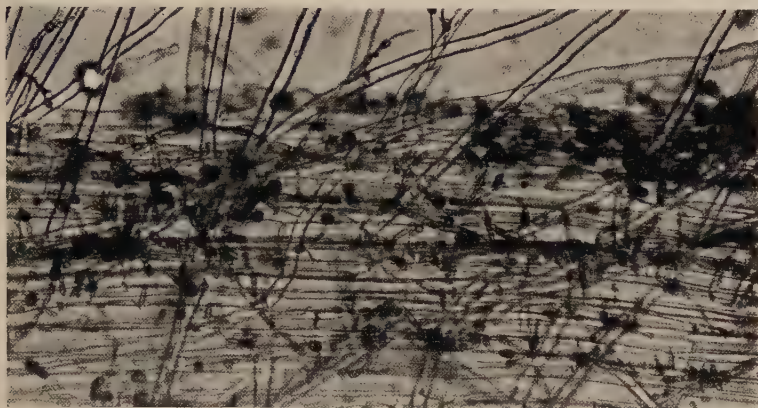


Abb. 1. *Ascochyta pinodella* auf der Wurzeloberfläche einer Weizenpflanze bei steriler Aufzucht.

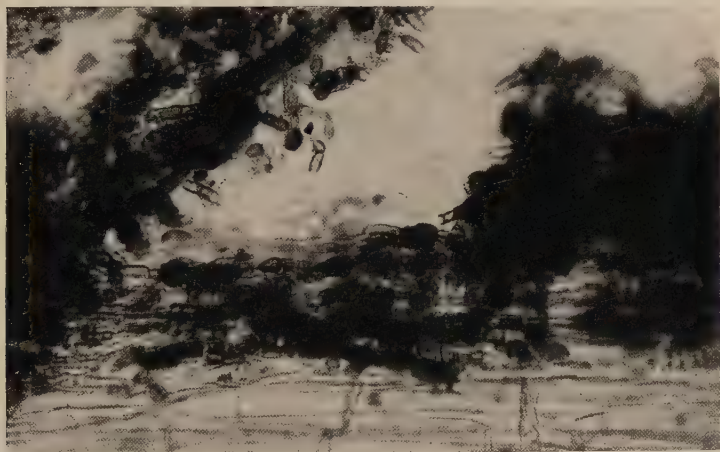


Abb. 2. *Ascochyta pinodella* auf der Oberfläche und in der Rindenschicht einer steril aufgezogenen Weizenpflanze. Längsschnitt, der die Dichte der aufliegenden Mycelmassen und die starke Durchwucherung der äußeren Rindenschichten erkennen läßt.

Die „normalerweise“ zu beobachtende Resistenz von Weizen gegen *Ascochyta pinodella* beruht also auf der infektionshemmenden Wirkung der Rhizosphärenflora. Infektionsversuche mit *Ascochyta pinodella* an Mais ergaben gleichsinnige Resultate (Abb. 4). Nur waren die Krank-

heitssymptome beim Mais weniger ausgebildet als am Weizen, und es fehlten die Anhäufungen des Mycels in der Rhizosphäre.

In gleicher Weise konnte gezeigt werden, daß die Resistenz von Mais und Weizen gegen ein von fußkranken Erbsenwurzeln isoliertes und ihnen gegenüber äußerst pathogenes *Fusarium culmorum* an die Gegenwart einer Rhizosphärenflora gebunden ist (Abb. 3 u. 5). Die Infektionsversuche an Mais und Weizen wurden hier ebenso wie die Infektion der

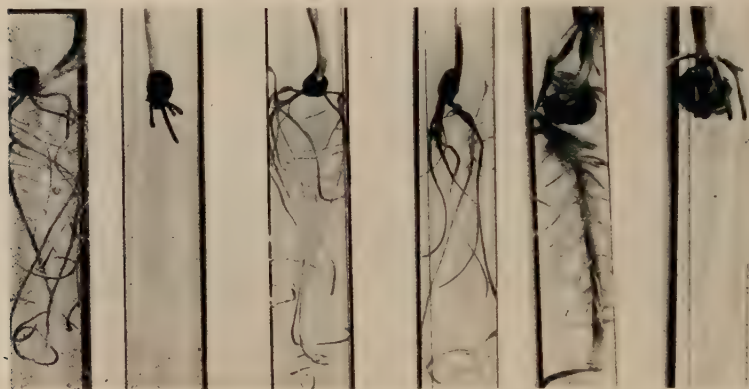


Abb. 3. Von links nach rechts: 1. Weizen, steril auf Zinzadze-Agar aufgewachsen. 2. Weizen unter sterilen Bedingungen mit *Fusarium* sp. infiziert. 3. Weizen, steril auf Zinzadze-Agar aufgewachsen. 4. Weizen unter sterilen Bedingungen mit *Ascochyta pinodella* infiziert. 5. Mais, steril auf Zinzadze-Agar aufgewachsen. 6. Mais unter sterilen Bedingungen mit *Fusarium* sp. infiziert. — Die scheinbar geschwärzten Wurzelpartien in 1, 3, 5 sind durch Reflexe vorgetäuscht. Die Wurzeln sind in den Kontrollen von rein weißer Farbe. Dagegen sind in 2 und 6 die Wurzelspitzen bräunlich verfärbt. Bei 4 ist der ganze dem Samen nächstliegende mehrere Zentimeter lange Wurzelteil von *Ascochyta pinodella* schwarz überzogen.

gleichen Pflanzen mit *Ascochyta pinodella* in natürlicher Erde so durchgeführt, daß die Samen pilzdurchwachsenen Agarscheiben von ca. 9 mm Durchmesser unmittelbar auflagen. Es fehlten jegliche Krankheits-symptome (Abb. 5). Wurden beide Pflanzen dagegen steril aufgezogen und auf Zinzadze-Agar mit dem *Fusarium* infiziert, so ergaben sich schwerste Krankheitsbilder (Abb. 3). Die Wurzeln werden bei Berühren des Mycels mit der Wurzelspitze sofort infiziert und stellen infolge toxischer Wirkungen und Zerstörung des Vegetationspunktes ihr Wachstum unter Bräunung ein (Abb. 3). Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß die letale Wirkung von *Fusarium culmorum* auf die Wurzeln von Mais und Weizen nicht einheitlicher Natur ist und sich, wie schon angedeutet, in zwei Komponenten auflösen läßt, nämlich den Einfluß toxischer Stoffwechselprodukte und die eigentliche Infektion. Und zwar überwiegt bei Weizen, wie die Wirkung von Kulturfiltraten des Pilzes zeigt, eindeutig die toxische Wirkung, die Infektion ist also eine vor-



wiegend sekundäre Erscheinung. Dagegen ist bei Mais diese toxische Wirkung zwar nachweisbar, aber doch in einem ungleich schwächeren Ausmaß; sie scheint also an Bedeutung hinter der eigentlichen Infektion zurückzustehen.

Eine Erörterung verdient zunächst noch die Frage, ob die Versuchspflanzen durch die sterile Kultur in ihrer Widerstandsfähigkeit so sehr



Abb. 4. Infektion von Mais durch *Ascochyta pinodella* unter sterilen Bedingungen. Das Zellgewebe der Wurzel ist vollgestopft mit *Ascochyta*-Mycel.

geschwächt werden, daß sie deshalb dem Pilz zum Opfer fallen. Es darf aber darauf hingewiesen werden, daß die sterilen Kontrollpflanzen durchweg kräftiger entwickelt waren als die Sämlinge in natürlichem Boden. Überdies ist bekannt, daß die Infektion der Baumwolle durch *Phymatotrichum omnivorum* (F. EATON und E. RIGLER) und — nach unseren Beobachtungen — die Infektion der Erbsen durch *Ascochyta pinodella* durch sterile Aufzucht keineswegs verstärkt wird. Die Bedeutung der wurzelnahen Mikroflora darf also auch von diesem Gesichtspunkt aus als gesichert angesehen werden.

Man könnte geneigt sein, die im Freiland stets beobachtete Resistenz von Mais gegen *Phymatotrichum omnivorum* bzw. die Widerstandsfähigkeit von Weizen und Mais gegen *Ascochyta pinodella* und das hier unter-

suchte *Fusarium* einer, trotz aller mikrobiologischen Differenzen in verschiedenen Böden, weitgehenden Konstanz im qualitativen und quantitativen Aufbau der Rhizosphärenflora zuzuschreiben. Voraussetzung wäre, daß die in der Rhizosphäre auftretenden Arten in jedem Bodentyp vorhanden wären, daß es sich also nur um weitverbreitete Formen handelt. Die bisherigen Befunde anderer Autoren über die Zusammensetzung der Rhizosphärenflora sprechen aber kaum für eine so weit-



Abb. 5. Infektionsversuche mit *Fusarium culmorum* an Weizen und Mais in natürlicher Erde. 1. Nicht infizierte Kontrolle von Weizen. 2. Weizen nach Infektion mit *Fusarium culmorum*. 3. Nicht infizierte Kontrolle von Mais. 4. Mais nach Infektion mit *Fusarium culmorum*. Unterschiede zwischen Kontrolle und Infektionsversuch fehlen, da in natürlicher Erde eine Infektion unmöglich ist.

gehende artgebundene Spezifität. Auch eigene Untersuchungen lassen erkennen, daß die resistenzbestimmende Wirkung der wurzelnahen Zone nicht an das Vorkommen einer qualitativ und quantitativ unveränderlichen Mikroflora gebunden ist. Wird nämlich Weizen in sterilem, mit Zinzadze-Lösung angefeuchtetem und in sterile Blumentöpfe eingefülltem Sand mit *Ascochyta pinodella* infiziert und stets mit sterilem Wasser gegossen, so bleiben die Wurzeln befallsfrei, und die Mycelanhäufungen in der Rhizosphäre unterbleiben. Die zufälligen, auf die Erdoberfläche gelangenden und von dort zur Rhizosphäre vordringenden Keime genügen also, um den Pilz aus der Rhizosphäre zu verdrängen und die Infektion zu verhindern. Es ist daher zu erwarten, daß bei Zugabe verschiedener Mikrobekulturen zu steril durchgeführten Infektionsversuchen keine sehr spezifische positive oder negative Wirkung, sondern eine häufig eintretende Verdrängung des Parasiten aus der Rhizosphäre zu beobachten sein wird.

Wahrscheinlicher ist daher die Annahme, daß die Wurzeln resistenter Pflanzen in ihrer Umgebung ein für den Parasiten relativ ungünstiges Milieu schaffen, aus dem er durch Konkurrenten leicht verdrängt wird, während er in der Rhizosphäre anfälliger Pflanzen unter günstigeren Voraussetzungen diesen Wettbewerb übersteht. So ist unter sterilen Bedingungen die Entwicklung von *Ascochyta pinodella* an Erbsenwurzeln viel kräftiger als an Weizen oder gar Maiswurzeln. Sie dringt aus der Rhizosphäre heraus tief in den Agar hinein, auf dem sie an sich nur sehr schlecht gedeihen kann. Sie kann dagegen die wurzelnahe Zone des Weizens nicht verlassen und in der Rhizosphäre von Mais ist makroskopisch keinerlei Anhäufung des dunklen *Ascochyta*-Mycels zu erkennen. Doch ergeben sich auch hier noch gewisse Schwierigkeiten, da diese positive Korrelation zwischen der Entwicklung von *Ascochyta pinodella* in der Rhizosphäre und der Infektionsstärke der Wurzeln nicht bei allen Pflanzen zu beobachten ist. So zeigt Raps in steriler Kultur auf Zinzadze-Agar eine auffallend starke Entwicklung von *Ascochyta pinodella* in der Rhizosphäre. Es entwickelt sich ein dichter Mantel von dunklem *Ascochyta*-Mycel, ohne daß der Pilz in die Wurzel einzudringen vermag. Umgekehrt ist bei Wicken unter den gleichen sterilen Bedingungen kaum eine Entwicklung des Pilzes in der Rhizosphäre, wohl aber ein Eindringen in die Wurzel zu erkennen. Das heißt: gute Entwicklung in der Rhizosphäre und Infektionsstärke der Wurzeln gehen nicht immer parallel, weil in der Wurzel lokalisierte Resistenzfaktoren nach dem Durchwachsen der Rhizosphäre über die Infektion entscheiden.

An eine ähnliche, antibiotische Wirkungen allerdings nicht berücksichtigende Bedeutung der Wurzelauausscheidungen haben schon TIMONIN (1940) sowie LOCHHEAD, TIMONIN und WEST (1940) gedacht, als sie auf die von ihnen festgestellte positive Korrelation zwischen der Mikrobenzahl in der Rhizosphäre und der Anfälligkeit von Flachssorten gegen „wilt“ und von Tabaksorten gegen „black rootrot“ hinwiesen. Sie sehen also in der Mikrobenzahl der Rhizosphäre einen Indikator für die Eignung der Wurzelzone als Milieu für parasitische Pilze. Wenn die aufgefundene Korrelation keine zufällige ist, stünde aber unseres Erachtens zu erwarten, daß für alle oder die meisten Wurzelparasiten die gleichen Resistenzverhältnisse bestehen, eine Annahme, die sich kaum bestätigen wird. Die Ergebnisse von EATON und RIGLER, die man zur Unterstützung dieser Theorie anführen könnte, halten einer Kritik nicht stand. Diesen Autoren gelang es, durch unterschiedliche Stickstoffernährung oder Verstümmelung (Entfernung aller Seitenzweige, Knospen und Samenkapseln) die Resistenz der Baumwolle gegen *Phymatotrichum omnivorum* erheblich zu beeinflussen. Dabei zeigten, wie in den Versuchen von TIMONIN, die anfälligsten Pflanzen die höchsten (etwa 926000), die resistentersten Exemplare die niedrigsten (etwa 384000) Keimzahlen in ihrer Rhizosphäre. Es bleibt allerdings nach unserer Auffassung unsicher, wie weit diese Unterschiede durch die Behandlung der Pflanzen ausgelöst wurden. Die Keimzahlbestimmungen wurden erst am Schluß des Versuches durchgeführt, als die Wurzeln der anfälligsten Pflanzen schon von *Phymatotrichum* zersetzt waren und daher Saprophyten die günstigsten Lebensbedingungen boten. Zudem können die Keimzahlen schwerlich in ursächlichem Zusammenhang mit der Resistenz



stehen, da nach EATON und RIGLER (1946) die Infektion der Baumwolle durch *Phymatotrichum omnivorum* durch die Ausschaltung der Rhizosphäre in steriler Kultur nicht beeinflußt wird.

Trotzdem ist die Bedeutung der Wurzelausscheidungen als Grundlage aller in der Rhizosphäre lokalisierten Resistenzfaktoren anzuerkennen. Doch darf nicht übersehen werden, daß sich der Parasit auch bei günstigster Zusammensetzung der Wurzelexkrete nur dann entwickeln kann, wenn er sich gegen die übrige Rhizosphärenflora durchzusetzen vermag, sei es, daß er antibiotische Wirkungen oder eine reine Nährstoffkonkurrenz überstehen muß. Hohe Keimzahl in der Rhizosphäre deutet also nicht, wie TIMONIN vermutet, ohne weiteres auf günstige Entwicklungsbedingungen für den Parasiten hin. Es ist im Auge zu behalten, daß eine starke mikrobiologische Tätigkeit auch kräftige antagonistische Wirkungen einzuschließen pflegt. Auf jeden Fall sind unsere Ergebnisse bezüglich der Resistenz der genannten Pflanzen gegenüber *Ophiobolus graminis*, *Ascochyta pinodella* und *Fusarium culmorum* nur durch die „Konkurrenz“ der Rhizosphärenflora zu erklären. Und berücksichtigt man, daß es sich bei der versuchsmäßigen Kombination von *Ascochyta pinodella* und *Fusarium culmorum* mit Weizen und Mais um die ersten, zufällig gewählten Zusammenstellungen im Zuge geplanter größerer Untersuchungen handelt, so darf man vermuten, daß diese Bedeutung der Rhizosphärenflora nicht selten zu finden sein wird.

Die Anfälligkeit der Baumwolle gegen *Phymatotrichum omnivorum* wird, wie oben erwähnt, ebensowenig wie die geringe Widerstandsfähigkeit von Erbsen gegenüber *Ascochyta pinodella* durch die Rhizosphärenflora spürbar beeinflußt. Sie steht hier an Bedeutung hinter anderen Resistenzfaktoren zurück. Verallgemeinerungen über den Resistenzmechanismus bestimmter Pflanzen gegen verschiedene Parasiten oder verschiedener Pflanzen gegen dieselben Parasiten sind also zu vermeiden. In der Wurzel selbst liegende, infektionshemmende Eigenschaften oder in der Rhizosphäre lokalisierte, von den Pflanzen oder der Rhizosphärenflora ausgehende biotische Resistenzfaktoren können in gleicher Weise über die Anfälligkeit einer Pflanze entscheiden. Daher ist nach Beseitigung der rhizosphärenbedingten Resistenz durch sterile Kultur immer noch ein deutlicher, aber infolge der verschiedenen Resistenzgrundlagen verminderter Unterschied in der Widerstandsfähigkeit von Erbsen und Weizen gegen *Ascochyta pinodella* zu beobachten.

Auch praktische Perspektiven zeichnen sich bereits ab. Wenn es auch in der Regel unmöglich ist, durch Impfung eines Bodens mit praktisch in Frage kommenden Mengen eines Pilzes eine biologische Bekämpfung durchzuführen, so erscheint es doch denkbar, nach Analogie der Leguminosen-Impfung mit *Bacterium radicicola* durch „Beizung“ von Samen mit bestimmten Mikroben-Kulturen bei Keimlingskrankheiten eine Ver-

drängung von Parasiten aus der Rhizosphäre zu erreichen und so die empfindlichsten Entwicklungsstadien von Sämlingen zu überbrücken. Dieses Verfahren scheint um so aussichtsreicher, als nach den Beobachtungen von SLYKHUIS (1947), die uns bei Abschluß dieser Veröffentlichung zugänglich wurden, um den Samen eine Sphäre mit besonderen mikrobiologischen Verhältnissen, eine „Spermatosphäre“, besteht, die ähnliche Eigenheiten wie die Rhizosphäre aufweist. Pilze, wie *Acremonium*, *Gliocladium fimbriatum* und *Phialophora*, die die Entwicklung von *Fusarium culmorum* auch bei kräftigster Beimpfung des Bodens nicht beeinflussen können, vermögen diesen Parasiten dagegen in der Spermatosphäre ganz zu unterdrücken. Physiologisch (Agarverflüssigung) und mikrobiologisch (reichliche Chlamydosporenbildung) sich manifestierende Sonderbedingungen hat unabhängig von den Beobachtungen von SLYKHUIS (1947) R. VON RÜMKER in der Spermatosphäre verschiedener Pflanzen unter sterilen Bedingungen beobachtet; sie wird über diese Probleme gesondert berichten.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß in natürlichem Boden der Auflauf und die Jugendentwicklung von *Mais* in einem geradezu erstaunlichen Ausmaß durch Unterlegen kleiner von *Fusarium culmorum* durchwachsender Agarscheibchen unter den Samen gefördert wird. Da nun an sich eine schwache toxische Wirkung solcher Agarscheibchen auf den *Mais* zu erwarten ist (siehe oben) und weiterhin die bessere Entwicklung allem Anschein nach auf dem Fehlen der sonst beim *Mais* so häufigen Auflaufschäden durch Keimlingsmykosen beruht, scheint es, daß sich um den Keimling und den Samen eine schützende Hülle von *Fusarium*-Mycel entwickelt, die den Sämling vor dem Zugriff anderer Parasiten schützt. Auf diese Weise wird hier der Pilz, der in steriler Kultur ein gefährlicher Parasit ist, zu einem „Nützling“, der gefährliche Parasiten aus der Rhizosphäre und der Umgebung des Samens abdrängt.

Es erscheint lohnend, die hier gemachten Erfahrungen über das Zusammenleben von Pilz und höherer Pflanze zu den Beobachtungen in Beziehung zu setzen, die bei der Untersuchung der Mycorrhizen, insbesondere der Waldbäume gemacht wurden. Die morphologische Untersuchung ist noch nicht abgeschlossen, aber es scheint, daß man die Beziehungen zwischen *Ascochyta pinodella* und dem *Weizen* am ehesten unter dem Begriff der Pseudomycorrhiza einordnen kann, der ja das Fehlen mancher typischer morphologischer Eigenheiten der Mycorrhiza und eindeutig parasitäre Züge auf seiten des Pilzes einbegreift. Zu der Erfahrung, daß die Durchsetzung der Gewebe von *Weizen* durch *Ascochyta pinodella* durch Ersatz des Leitungswassers im Zinzadze-Agar durch Erdextrakt deutlich herabgesetzt wird, ist auf die von BJÖRK-MANN (1942) bei Veränderung des N- und P-Gehaltes des Bodens beobachtete Beeinflussung der Mycorrhizabildung bei Kiefern hinzuweisen.

Besonderes Interesse verdienen aber die Beobachtungen von REXHAUSEN (1920), nach denen bei Fichten, die in gleichmäßig kräftigem Zustand aus der Baumschule kamen, die Mycorrhiza bei Aufzucht in Sand stark, mit kräftigem intercellularem Netz und intracellulärer Verpilzung in den schwächlichen Pflanzen entwickelt war, während die Mycorrhiza bei Kultur in Gartenerde zumeist bei kräftigem Wuchs der Pflanzen abgestorben war. REXHAUSEN suchte die Erklärung für diese Erscheinung vor allem in der Beeinflussung der Widerstandskraft der Pflanzen gegen das Eindringen des Pilzes durch die unterschiedliche Versorgung mit Nährstoffen. Wäre es aber nicht denkbar, daß primär die unterschiedliche Mikroflora des Bodens und der Rhizosphäre die Lebensbedingungen der Mycorrhizapilze so beeinflußt, daß, wie bei der Ophiobolose des Weizens, im Sand die „Infektion“ heftig, in Gartenerde dagegen schwach verläuft und erst sekundär durch die starke Verpilzung im Sandboden Wuchsschäden auftreten? Nach unseren Erfahrungen liegt eine solche Erklärung außerordentlich nahe. Schon REXHAUSEN schreibt in diesem Zusammenhang: „Wahrscheinlich kommt auch nicht nur den chemischen, sondern auch den physikalischen Eigenschaften des Bodens eine bestimmende Rolle zu. Ja, die Gesamtheit der biologischen Faktoren, die zu übersehen wir noch gar nicht in der Lage sind, wird von Einfluß sein.“ Und sollte nicht die Beobachtung von MELIN (1925), daß bei Synthese von Kiefern und Fichten mit ihren Mycorrhizapilzen in Reinkultur unter Umständen Pseudomycorrhizen mit deutlichen Zügen von intolerantem Parasitismus auftreten, ebenso auf die fehlende Konkurrenz der Bodenmikroben zurückgeführt werden können?

Es lassen sich darüber hinaus in den Mycorrhizauntersuchungen von LIHNELL (1939) und HATCH (1934, 1937, zit. nach LIHNELL) unmittelbare Parallelen zu den von uns gemachten Untersuchungen finden. So beobachtete LIHNELL, daß *Rhizoctonia juniperi*, die aus 24 von 105 Wurzelstücken des Wacholders auswuchs, also sehr häufig mit ihm vergesellschaftet sein muß, in Reinkultursynthese den Wacholder bis in die oberirdischen Organe hinein inter- und intracellulär durchwucherte und rasch zugrunde richtete. Ebenso berichtet HATCH (nach LIHNELL) daß *Mycelium radialis atrovirens*, das ein ständiger Begleiter oder harmloser Endoparasit von *Picea abies* und *Pinus silvestris* ist, in Reinkultur mit aseptischen Fichten- und Kiefernpflanzen zusammengebracht, äußerst aggressiv wird und die befallenen Pflanzen in kurzer Zeit tötet. Bei der Diskussion dieser Zusammenhänge hat man bisher die Bedeutung antibiotischer Erscheinungen oder überhaupt biotischer Einflüsse im Boden und der Rhizosphäre ganz außer acht gelassen. Es scheint daher in jedem Falle lohnend, das Mycorrhizaproblem einmal von dieser Seite aus experimentell zu untersuchen, und zwar insbesondere unter Benutzung von Wirtspflanzen wie Weizen usw., die unter bestimmten



Bedingungen anscheinend ähnliche Symbiosen mit Pilzen bilden können, dabei aber in wenigen Tagen steril heranzuziehen sind. Zudem tritt die Dynamik eines chemischen Gleichgewichtes auch erst bei seiner Verschiebung klar hervor und kann erst dann qualitativ und quantitativ erfaßt werden. Ebenso wird die Abwandlung des Parasitismus, also einer Dyssymbiose in Richtung auf eine Eusymbiose nach Art der Mycorrhiza und die inverse Verschiebung des eusymbiotischen Gleichgewichts zur dyssymbiotischen Pseudomycorrhiza mit ihren eindeutig parasitischen Zügen am ehesten dazu führen, daß man Art, Stärke und Richtung der im Gleichgewicht wirksamen Kräfte erfaßt.

### Zusammenfassung.

Die Resistenz verschiedener dikotyler Pflanzen gegenüber *Ophiobolus graminis*, sowie von Weizen und Mais gegenüber *Ascochyta pinodella* und *Fusarium culmorum* ist in allerdings verschiedenem Ausmaß durch die Mikroflora der Rhizosphäre bedingt. Bei steriler Aufzucht in einem mit Zinzadze-Lösung getränkten Sand oder entsprechendem Agar tritt infolge des Fehlens der Mikroflora eine Infektion der Wurzeln dieser Pflanzen durch die genannten Parasiten ein. *Ascochyta pinodella* bildet dabei an Weizen eine Wurzelverpilzung mit mycorrhizaähnlichem Charakter (Pseudomycorrhiza) aus. Die resistenzbestimmenden Eigenschaften der Rhizosphäre scheinen dabei nicht an eine ganz spezifische Zusammensetzung der Rhizosphärenflora gebunden zu sein, da sie auch nach Infektion steriler Böden mit Laboratoriumskeimen auftreten. Impfung von Mais mit *Fusarium culmorum* fördert die Jugendentwicklung deutlich, und zwar anscheinend vor allem durch Verminderung von Keimlingskrankheiten. Es erscheint daher nicht aussichtslos, Keimlingsmycosen auch in anderen Fällen durch Impfung der Samen mit bestimmten, sich in der Rhizo- und Spermatosphäre besonders gut entwickelnden und stark antibiotisch wirksamen Mikroben zu verhindern.

### Literatur.

- BJÖRKMANN, E.: Über die Bedingungen der Mycorrhizabildung bei Kiefer und Fichte. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, **6**, 190 (1942). — EATON, M., and E. RIGLER: Influence of carbohydrate levels and root-surface microfloras on *Phymatotrichum* root rot in cotton and maize plants. *J. Agric. Res.*, Washington, **72**, 137—161 (1946). — GARRETT, S. D.: Factors affecting the severity of take-all. *J. agric. South. Austral.* **37**, 664, 799, 976 (1934). — ISAKOWA, A. A., u. A. SMIRNOVA: The influence of various microbe complexes of bacteriorhizas on the development of higher plants. *C. R. (Doklady) Acad. Sci. USSR, Moscou*, **14**, 397—398 (1937). *Ref.: Bot. Zbl.*, **30**, 41, 342 (1937/38). — LIHNELL, D.: Untersuchungen über die Mycorrhizen und die Wurzelpilze von *Juniperus communis*. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, **3**, 141 (1939). — LOCHHEAD, A. G., M. I. TIMONIN, and P. M. WEST: The microflora of the rhizosphere in relation to resistance of plants to soil-born pathogens. *Sci. Agric.*, Ottawa, **20**, 414—418 (1940). — MELIN E.:

Untersuchungen über die Bedeutung der Baummycorrhiza. Jena 1925. — MÜLLER-KÖGLER, E.: Untersuchungen über die Schwarzbeinigkeit des Getreides und den Wirtspflanzenkreis ihres Erregers. Arb. Biol. Reichsanst. Berlin-Dahlem **22**, 271—319 (1938). — REXHAUSEN, L.: Über die Bedeutung der Mycorrhiza für die höheren Pflanzen. Beitr. z. Biologie d. Pfl. **14**, 19—58 (1920). — RIPPEL, A.: Allgemeine Grundlagen der mikrobiologischen Bodenuntersuchung (Bestimmung der Zahl). Forschungsdienst, Neudamm, **1** 28—33 (1936). — SLYKHUIS, J. R.: Studies on Fusarium culmorum blight of crested wheat and brome grass seedlings. Canad. J. Res., Ottawa **25**, 155—180 (1947). — STILLE, B.: Untersuchungen über die Bedeutung der Rhizosphäre. Arch. Mikrobiol. **9**, 477—485 (1938). — TIMONIN, M. I.: The interaction of higher plants and soil microorganisms. I. Microbial population of rhizosphere of seedlings of certain cultivated plants. Canad. J. Res., Sect. C. Bot. Sci., Ottawa **18**, 307—317 (1940). Ref.: Biological Abstr. **15**, 956 (1941); The interaction of higher plants and soil microorganisms. II. Study of the microbial population of the rhizosphere in relation to resistance of plants of soil born diseases. Canad. J. Res., Sect. C. Bot. Sci., Ottawa **18**, 444 (1940). Ref.: Biological Abstr. **15**, 956 (1941). — WINTER, A. G.: Der Einfluß partieller Sterilisation des Bodens auf die Entwicklung der Laufhyphen von *Ophiobolus graminis*. Phytopathol. Z. **14**, 204—302 (1942); Untersuchungen über die Beziehungen zwischen *Ophiobolus graminis* und andere Organismen mit Hilfe der Aufwuchsplattenmethode. Archiv Mikrobiol. **14**, 240—270 (1949). Untersuchungen über die Ökologie und den Massenwechsel bodenbewohnender mikroskopischer Pilze. I. Die Bedeutung organischer Nährstoffe für die Entwicklung von *Ophiobolus graminis* in der Rhizosphäre und im freien Boden. Arch. Mikrobiol. **15**, 42 (1950). — Die ausländische Literatur konnte nur in dem hier genannten Umfang berücksichtigt werden. Weitere eventuell nach 1939 erschienene ausländische, die angeschnittenen Probleme berührende Veröffentlichungen waren den Verfassern nicht zugänglich oder bekannt.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie „Schott-Zeiß-Institut“, Jena\*.)

## Methoden der Selektion zur Steigerung der antibiotischen Wirksamkeit bei *Penicillium notatum*.

Von

GOTTFRIED BRINGMANN.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. April 1949.)

Die Penicillinproduktion beruht wie eine Reihe von Zweigen der chemischen Industrie auf der physiologischen Tätigkeit von Schimmelpilzen. Die Qualität der interessierenden physiologischen Eigenschaften der Pilze und damit die Produktionskapazität des Betriebes ist abhängig von der Art bzw. der Leistung der zur Verwendung kommenden Pilzstämme. Man wird mithin bestrebt sein, durch biologische Züchtungsmaßnahmen die gewünschten Eigenschaften eines einmal als geeignet erkannten Pilzstammes zu verbessern bzw. auf der durch biologische Auswahl erreichten Höhe zu halten.

Die Erfahrung der technischen Mykologie lehrt, daß ohne eine laufende Selektion mit einer unvermeidlichen biologischen Wertminderung (BERNHAUER) oder „Ermüdung“ (KILLIAN) des Arbeitsmaterials bzw. Bildung „abweichender Typen“ (COGHILL) zu rechnen ist. Letztere Gefahr läßt sich auf die Dauer nicht vermeiden, wenn sie auch durch besondere Maßnahmen der Konservierung des Impfmateri als eingeschränkt werden kann, unter anderem durch lyophile Trocknung, Herstellung von Erdpräparaten (COGHILL), Talkumpräparaten (BERNHAUER), geeigneten Agarpräparaten auf Schrägröhrchen, sowie kühler trockener Lagerung ( $+2^{\circ}$  bis  $+3^{\circ}$  C) (COGHILL), unter Umständen auch durch Hungerpassagen (KILLIAN).

Die Gefahr der biologischen Wertminderung eines Pilzstammes ergibt sich daraus, daß in der Folge der laufenden Abimpfungen, deren Material dem Zufall überlassen ist, wiederholt Sporen geringerer — im vorliegenden Fall antibiotischer — Wertigkeit zur Weiterzucht gelangen. Als Ursachen der Degeneration gelten ungeeignete Lagerung des Impfmateri als bei zu hoher Temperatur und Feuchtigkeit bzw. wiederholte Passagen eines Stammes über reiche Nährböden (COGHILL, KILLIAN).

Für die ersten Penicillin-Laboratoriumsversuche und Produktionsarbeiten ist von uns aus einer Reihe von Stämmen der Stamm *Penicillium notatum* SGP 23 verwendet worden. Die mit diesem Stamm zunächst erzielten hochwertigen Laboratoriumsergebnisse sanken im Verlauf der sich entwickelnden Produktion merklich ab, als man dazu überging, das Impfmateri als in größerem Maßstab zu vermehren. Das Endergebnis der fortschreitenden Degeneration des Stammes war das Absinken der Produktion bis auf wenige Internationale Einheiten (IE) im ml. Um der

---

\* Anschrift des Verf.: Berlin-Dahlem, Kaiser-Wilhelm-Institut, Abt. f. Mikromorphologie.



wachsenden Gefahr der völligen Degeneration des Stammes wirkungsvoll zu begegnen, gingen wir den gleichen Weg, wie er in der Pflanzenzucht üblich ist:

1. Auf Grund entsprechender Bestimmungen des antibiotischen Wertes werden aus dem jeweils vorhandenen Material nur die besten Kulturen selektiv weitergezüchtet. — 2. Die Reinerbigkeit des verwendeten Materials gilt als Grundlage für die Beständigkeit der zu erzüchtenden antibiotischen Qualität.

### Genetische Voraussetzungen und Möglichkeiten einer antibiotischen Selektion bei *Penicillien*.

Nach SCHÜRHOFF, ELISEI, WAKAYAMA, PONTECORVO und GEMMEL sind die Mycel-Zellen der *Penicillien* vielkernig, die Konidiosporen dagegen besitzen nur einen Kern. Sowohl die Kerne der Mycelzellen wie die Kerne der Konidiosporen enthalten zwei Chromosomen. Da die Generationsfolge bei den *Penicillien* in der Hauptsache ungeschlechtlich über Konidiosporen abläuft, ist die Möglichkeit einer Neukombination der Gene — bzw. einer Reduktionsteilung — verbunden mit einem eventuellen Gen-Austausch nicht anzunehmen; Beobachtungen über Fusionen vegetativer Kerne liegen nicht vor.

PONTECORVO und GEMMEL erzielten zwar durch Fusionen von Hyphen verschiedenen Ursprungs heterokaryotische Mycelien. Bei Aussaat der von letzteren gebildeten Konidiosporen erhielt man jedoch die beiden Kombinationspartner in reiner Form zurück. Die Trennung der bei der Fusion ausgetauschten Kerne erfolgt nach der Bildung der Fruchttträger bei der Abschnürung der Konidiosporen. Einsporen-Stämme von *Penicillien* müssen demnach als erbeinheitlich und erbkonstant gelten, abgesehen von Fällen spontaner Gen-Mutationen. Mit der Konstanz der Kernverhältnisse der Einsporen-Stämme (Klone) dürfte auch die Konstanz ihrer antibiotischen Anlagen gegeben sein.

Für das Vorhandensein eines konstanten antibiotischen Erbfaktors sprechen Arbeitsergebnisse mit den durch Colchicinpassagen erhaltenen polyploiden *Penicillium*-Stämmen, die einer der Erhöhung der Chromosomenzahl (4, 6 und 8 Chromosomen) direkt proportionale additive Steigerung der Penicillin-Bildung aufwiesen (BUCKLAND). Im Gegensatz zu den Einsporen-Stämmen sind Wildstämme als Populationen mit einer durch Hyphenfusionen bedingten Heterokaryosis ihrer Mycelien anzusehen und besitzen dementsprechend eine uneinheitliche antibiotische Erbanlage.

Wird bei den Einsporen-Stämmen eine konstante antibiotische Erbanlage angenommen, so erklären sich Schwankungen ihrer antibiotischen Aktivitätswerte als phänotypische Variationen. Es dürfte

sich um Veränderungen handeln, deren Beständigkeit von Umweltbedingungen abhängig sein wird (Abwertung der antibiotischen Aktivität durch Passagen über flüssige Nährböden [T. 12 u. 17], Bildung „abweichender Typen“ durch Dauer-Einfluß reicher Nährböden bzw. ansteigender Temperatur [COGHILL], Reaktivierung „ermüdeter“ Stämme durch Hunger und thermische Reize [KILLIAN]).

Als Aufgabe einer antibiotischen Selektion ergibt sich nach vorstehenden Feststellungen: 1. Aus natürlichem Material müssen Stämme hoher antibiotischer Erbanlage ausgewählt werden. — 2. Im erbreinen und erbeinheitlichen Einsporen-Material dieser Stämme gilt es, positive Variationen zu finden, durch laufende Selektionen in Verbindung mit geeigneten Passagen aus ihnen immer wieder das antibiotisch hochwertigste Material auszuwählen und so der antibiotischen „Ermüdung“ (KILLIAN), der die Variationen unterliegen, entgegenzuarbeiten. Ein Überschreiten des Optimums der anlagemäßig gegebenen antibiotischen Aktivität ist naturgemäß bei einer Selektion von rein phänotypischen Variationen nicht möglich. — 3. Die antibiotische Selektion soll durch Auffindung spontaner Mutanten bzw. in Verbindung mit Arbeitsmethoden, die die Herbeiführung induzierter Gen-Mutationen oder polyploider Formen ermöglichen, neue erbreine und erbkonstante Stämme mit einer gesteigerten antibiotischen Anlage herauszüchten.

## Methodik und praktische Durchführung der antibiotischen Selektion bei *Penicillium notatum*.

Während es bei der Zuchtwahl höherer Pflanzen und Tiere ohne weiteres möglich ist, im Rahmen der Vererbungsgesetze das Erbgut ungestört rein weiterzugeben, ist bei der Zuchtwahl von Schimmelpilzen die Einsporenkultur eine selbstverständliche Voraussetzung.

### I. Einsporen-Isolierung.

Es gibt eine Reihe von Methoden, Pilzkulturen zu erhalten, deren Ursprung in einer bzw. wenigen Sporen liegt:

1. Die einfachste Methode ist die Verdünnungsmethode (nach HANSEN bzw. BERNHAUER). — 2. Ein weiterer Weg Einsporenkulturen zu bekommen, ist die Methode der sogenannten Federstrich-Kulturen (nach HENNEBERG). — 3. Zu erwähnen wäre auch das Tuschepunkt-Verfahren. — 4. Die für unsere speziellen Verhältnisse entwickelte Punktimpfungsmethode ist in einem späteren Kapitel näher erläutert.

Der Vorteil der Arbeitsarten 1., 2. und 4. ist die ohne große Mühe erreichbare hohe Anzahl von Einzelkulturen, allerdings ist die Garantie, mit diesen Methoden auch wirklich nur eine einzelne Spore isoliert zu haben, nicht vollkommen. Man muß sich vor Anwendung der Methode klar sein, ob es wichtiger ist, eine recht große Anzahl von Einzelkulturen

und damit ein sehr zahlreiches Untersuchungsmaterial zu haben, allerdings unter teilweise Verzicht auf ein vollkommen einheitliches Erbgut, oder ob man sich mit einer geringen Anzahl von Einsporen-Kulturen begnügen will, dafür aber die Erbeinheitlichkeit der aus ihm erhaltenen Kultur sicherstellt.

Gibt man der letztgenannten Frage den Vorzug, so ist es notwendig, Einzelsporen mit Hilfe des Mikromanipulators zu erhalten. Die Nachteile dieser Methode sind: Ein größerer technischer Aufwand und ein höherer Zeitbedarf. Letzterer begründet sich folgendermaßen: Nur ein verhältnismäßig geringer Prozentsatz der mit Hilfe des Mikromanipulators isolierten Einzelsporen keimt auch tatsächlich aus. Um eine ausreichende Anzahl von Einsporenkulturen zu erhalten, wie sie für die Durchführung der Zuchtwahl an einem Pilzstamm notwendig sind, muß man eine beträchtlich hohe Anzahl von Isolierungen vornehmen. Da die Isolierung einer Einzelspore mit Hilfe des Mikromanipulators erheblich mehr Zeit beansprucht als mit Hilfe der beiden vorgenannten Methoden, so kann man in der gleichen Zeit nur eine wesentlich geringere Anzahl von Abimpfungen vornehmen. Will man andererseits auf die gleiche Menge Untersuchungsmaterial zurückgreifen wie bei den vorhergenannten Methoden, so muß man vergleichsweise erheblich mehr Zeit aufwenden.

#### *A. Vorbereitung des Sporen-Materials.*

Für eine erfolgreiche Isolierung der Einzelsporen ist die physikalische Beschaffenheit des verwendeten Sporen-Materials von grundlegender Bedeutung. Nach den vorliegenden Erfahrungen vieler tausend Einsporen-Isolierungen muß die Kulturdecke, der die Sporen für den Ausstrich entnommen werden, möglichst trocken sein. Ein Nährboden, der die Guttation fördert (Czapek-Dox, flüssiger Nährboden), ist von uns daher möglichst für die sporenliefernde Kulturdecke vermieden worden. Als geeignet ist Coghill-Agar anzunehmen.

Ließ sich Czapek-Dox, bzw. flüssiger Nährboden als Träger der Mutterkultur nicht vermeiden, so trocknete die Kulturdecke — nach Abgießen der Guttations-Tropfen bzw. der Kulturlösung — vor Entnahme des Sporenmaterials für den Isolierungsausstrich entweder in einem Exsiccator bei Zimmertemperatur über Calciumchlorid oder Kieselgel, mittels einer Gasballast-Vakuumpumpe und vorgeschalteter Ausfrier tasche oder im Hoch-Vakuum aus der Eisphase mit der gleichen Evakuierungs-Einrichtung. Die Aufbewahrung des getrockneten Sporenmaterials erfolgte im Exsiccator über einem Wasser-Adsorbens, nachdem der Atmosphärendruck durch sterile Luftzufuhr über Jenaer G 3-Luftfilter hergestellt worden war.



Es besteht auch die Möglichkeit der physiologischen Trocknung und sekundären Versporung durch nachträgliches Unterschichten der Kulturdecke mit steriler gesättigter Lactoselösung. Es gelang damit, ein vorzeitiges Auskeimen der Sporen auf der Kulturdecke zu verhindern. Submerses Material läßt sich recht gut auf Czapek-Dox-Agar austreichen. Es konnte auch nach Abgießen der Kulturflüssigkeit unter Ausbreiten des Mycels in dünner Schicht in Schrägröhrchen Versporung erhalten werden, die in wenigen Tagen erfolgte. Doch sind die so erhaltenen Sporen wenig keimfähig, und die aus ihnen erwachsenden Kulturen antibiologisch von geringerer Qualität.

Sporenmaterial, das den richtigen Trockenheitsgrad besitzt, läßt sich genügend diffus auf das Deckglas austreichen; die Sporen haften dem Deckglas nur leicht an und lassen sich daher leicht isolieren. Auch sind die Sporen gegen mechanische Beschädigungen beim Isolierungsvorgang viel weniger empfindlich, so daß die Keimungsrate entsprechend günstiger liegt.

### *B. Der Isolierungsvorgang.*

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Einsporen-Isolierung ist mit Hilfe des ZEISS'schen Gleit-Mikromanipulators durchgeführt worden unter Verwendung der von CHRISTOPHERSEN für Bakterien-Isolierung entwickelten Methode.

Das für die Isolierung von Einzelsporen bestimmte Sporenmaterial wird von einem Schräg-Agar-Röhrchen mit einer sterilen Impföse trocken abgeimpft und auf der Unterseite eines sterilen Deckglases ausgestrichen. Für diesen Arbeitsgang eignen sich am besten lange Impfösen aus gut federndem dünnen Draht. Mit Hilfe so geformter Impfösen vermeidet man die Gefahr einer Zerquetschung der Sporen beim Austreichen auf das Deckglas.

Das Deckglas wird anschließend auf die Öffnung der Deckplatte der Mikrokammer gelegt und bei Bedarf mit sehr wenig Vaseline leicht befestigt. Als brauchbare Vergrößerung für die Isolierungsarbeit empfiehlt sich ein Objektiv von 20 bis 40facher Vergrößerung und ein entsprechendes Okular von 10—20facher Vergrößerung, so daß der Gesamtabbildungsmaßstab von 200:1 bis 800:1 beträgt. Eine stärkere Vergrößerung erwies sich als unpraktisch, da das mit ihr erhaltene Gesichtsfeld zu klein wird.

Nachdem das für die Isolierung als geeignet erscheinende Sporenmaterial in das Gesichtsfeld gebracht ist — als geeignet erwies sich eine Verteilung der Sporen mit mindestens 1,5—2 Nadelkugeldurchmessern Abstand zwischen den einzelnen Sporen — wird mit Hilfe von Mikroglaskugelnadeln in der bekannten Weise (CHRISTOPHERSEN, JANKE) die Isolierung der Einzelsporen vorgenommen.

Um vor unbeabsichtigtem Mitschleppen von Fremdsporen geschützt zu sein, ist es notwendig, nach Isolierung der Einzelspore eine mikroskopische Nachkontrolle durchzuführen. Zu diesem Zweck bringt man die Kugelnadel zuerst mit Hilfe des vertikalen Feintriebes des Mikromanipulators aus der optischen Ebene des Mikroskopes heraus, so daß ihre Spitze etwa 1—2 mm unterhalb des Deckglases zu liegen kommt. Dann wird die optische Ebene des Mikroskopes nachgeführt, bis die Kugel bzw. der ihr benachbarte Teil des Schaftes im Gesichtsfeld auftaucht. Ist die Kugelnadel wieder ins Gesichtsfeld gebracht, so kann sie durch Verschieben der optischen Ebene daraufhin untersucht werden, ob nicht außer der isolierten Einzelspore weitere Sporen an der Nadel haften geblieben sind. Werden bei der Untersuchung keine Fremdsporen festgestellt, so wird mit Hilfe einer feinen ab-

geflamten Pinzette das vorsichtig abgebrochene Nadelende mit Kugel und daran haftender Einzelspore auf geeigneten, sterilen Agar gebracht.

Die Bebrütung der Einzelsporen erfolgt nach ihrer Isolierung und Abimpfung bei 24° C in einer feuchten Kammer. Eine gewisse Anzahl, deren Höhe von verschiedenen Faktoren abhängt (Tab. 1), keimt aus und bildet Mycelinseln, deren Sporen weiter abgeimpft werden können. Auf Grund des Ursprungs aus einer einzelnen Spore ist das dabei erhaltene Sporenmaterial hinsichtlich seiner Erbmasse einheitlich, und den aus ihm erhaltenen Pilzkulturen liegt ein einheitliches antibiotisches Erbgut zugrunde.

Die Einzelsporen werden nach dem Verfahren der Mikrokultur (KNÖLL) zur Entwicklung gebracht und auf ihren Penicillinwert getestet. Technisch gingen wir dabei so vor, daß die Applizierung der Einzelsporen auf den Mikro-Glaskugeln aus Vergleichbarkeitsgründen auf standardisierte Mengen (0,1 ml) Czapek-Dox-Agar in entsprechenden Mikro-Einheitsglasringen erfolgte. Jeder anwachsenden Einsporen-Mikrokultur stehen so von vornherein der gleiche Lebensraum und die gleichen Nährstoff- und Wassermengen zur Verfügung, so daß die Umweltbedingungen für das Wachstum der Kultur und die Wirkstoffbildung als weitgehendst normalisiert anzusehen sind und somit der Erbwert der Kultur rein in Erscheinung treten kann.

### *C. Keimungsrate von Einzelsporen.*

Für den Erfolg der Selektionsarbeit ist die Keimungsrate der Einzelsporen von wesentlicher Bedeutung. Sie ist von einer Reihe von Faktoren abhängig. Zunächst ist die äußere Beschaffenheit der Sporen, die ihrerseits vom Nährboden der Mutterkultur bedingt ist, von großer Bedeutung. Welchen Einfluß der Nährboden der Ausgangskultur auf die Keimungsrate der von ihr isolierten Einsporen hat, sei an den Beispielen der Tab. 1 gezeigt.

Abgesehen von der äußeren Beschaffenheit der Sporen ist die Keimungsrate wesentlich stammbedingt, wie das vorhergehende Beispiel bereits zeigte und im nachfolgenden noch einmal zum Ausdruck kommt. Eine bedeutende Rolle spielt, wie nachstehendes Versuchsergebnis zeigen soll, der Nährboden, auf den die Einzelspore appliziert wird.

Von dem Stamm *E 527* keimten bei Verwendung von Czapek-Dox-Agar mit Hefeextrakt (300 mg Stickstoff je Liter) von 1053 Einzelsporen 152 aus (Keimungsrate 14%). Bei Verwendung von Bierhefehydrolysat als Wachstoffsstoff mit Czapek-Dox-Agar keimten von 351 Einzelsporen des gleichen Stammes 73 aus (Keimungsrate 21%). Auf Coghill-Agar keimten bei dem gleichen Stamm von 230 Einzelsporen 50 aus (Keimungsrate 22%).

Von Stamm *P 64* keimten von 539 isolierten Sporen auf Czapek-Dox-Agar mit Hefeextrakt 186 (Keimungsrate 35%). Bei Verwendung von Bierhefehydrolysat als Wachstoffsstoff für Czapek-Dox-Agar keimten von 500 isolierten

Tabelle 1. Bedeutung des Nährbodens der Ausgangskultur für das Auskeimen der Sporen.

	Coghill-Agar (siehe S. 92)	Czapek-Dox-Agar (siehe S. 92)
<i>Stamm SR 1813</i>	isoliert . . . . . 40 ausgekeimt . . . . . 34 Prozent . . . . . 85	isoliert . . . . . 40 ausgekeimt . . . . . 16 Prozent . . . . . 40
<i>Stamm S 1521</i>	isoliert . . . . . 90 ausgekeimt . . . . . 21 Prozent . . . . . 24	isoliert . . . . . 80 ausgekeimt . . . . . 5 Prozent . . . . . 6
<i>Stamm S 1218</i>	isoliert . . . . . 100 ausgekeimt . . . . . 33 Prozent . . . . . 33	isoliert . . . . . 180 ausgekeimt . . . . . 12 Prozent . . . . . 7
<i>Stamm S 1208</i>	isoliert . . . . . 90 ausgekeimt . . . . . 26 Prozent . . . . . 29	isoliert . . . . . 200 ausgekeimt . . . . . 6 Prozent . . . . . 3
<i>Stamm S 1217</i>	isoliert . . . . . 100 ausgekeimt . . . . . 35 Prozent . . . . . 35	isoliert . . . . . 120 ausgekeimt . . . . . 2 Prozent . . . . . 2

Einzelsporen dieses Stammes 339 aus (Keimungsrate 67,8%). Auf Coghill-Agar lag die Keimungsrate mit 299 zu 520 isolierten Sporen bei 58%.

Diese Keimungszählung ergibt, abgesehen von dem grundlegendsten Unterschied der Stammverschiedenheit, die Tatsache der besonderen Eignung von Czapek-Dox-Agar mit Bierhefehydrolysat als Wuchsstoff. Ihm wäre unter Umständen Coghill-Agar gleichzustellen, während Czapek-Dox-Agar mit Hefeextrakt als Wuchsstoff sich als ungeeignet für die Applizierung von Einzelsporen erwies.<sup>1</sup>

Von wesentlicher Bedeutung — auch für die Beimpfung von Produktions-Kulturgefäßen — ist die Tatsache, daß mit dem Alter des Stammröhrchens die Keimungsrate der Einzelsporen sinkt, wie nachstehende Versuchsreihe (mit 300 isolierten Einzelsporen je Versuchstag) erkennen läßt (Tab. 2).

Tabelle 2. Alter der Stammröhrchen und Absinken der Keimungsrate.

	Reihe I.	Reihe II.
Alter des Stammröhrchens Tage . . .	5 7 12 18	12 14 16 17 18 19 20 23
Keimungsrate Prozent . . . . .	85 78 57 29	57 53 46 30 26 20 16 6

<sup>1</sup> In diesem Zusammenhang sei bemerkt, daß wir auf Anregung von Prof. RENNER eine Benetzung der Nadelkugel, die zur Isolierung der Einzelsporen verwendet wird, mit Narbenschleim von *Oenothera-Lamarckiana*-Blüten vornahmen. Eine leichte Erhöhung der Keimungsrate gegenüber mit Agar benetzten Nadelkugeln war hierdurch feststellbar, wie nachstehendes Versuchsergebnis zeigt:

	isoliert 400	isoliert 100
<i>Narbenschleim</i>	ausgekeimt 234	Agar ausgekeimt 47
	Prozent 59	Prozent 47



Das Absinken ist besonders rapid bei Verwendung von Coghill-Agar als Ausgangsnährboden, während die Keimfähigkeit auf Bierwürze-Agar (s. unten) länger erhalten bleibt. Allerdings machen sich auch hier Stammesunterschiede bemerkbar.

Nachstehend sei die Zusammensetzung der im vorangegangenen Abschnitt erwähnten Nährböden gegeben:

Coghill-Agar: Glycerin 7,5 g; Melasse 7,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,05 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06 g; Pepton 5,0 g; NaCl 4,0 g; Fe (als Ferrichlorid, -Sulfat oder -Tartrat) 0,003 g; Cu (als Sulfat) 0,001 g; auffüllen auf 1000 ml aqua dest.; 30 g Agar in 300 ml aqua dest. werden mit 700 ml obiger Lösung gemischt.

Czapek-Dox-Agar: Lactose 40,0 g;  $\text{NaNO}_3$  3,0 g; KCl 0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g;  $\text{FeSO}_4$  0,01 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,00 g; Bierhefe oder Hefeextrakt 300—800 mg Stickstoff/l; Agar-Agar 30 g; auffüllen auf 1000 ml aqua dest.

Bierwürze-Agar: 500 ml blanke Würze (12—18° Bllg.); 500 ml aqua dest.; 30 g Agar werden in einen Liter obiger Nährlösung eingebracht.

## II. Austestung der antibiotischen Aktivität.

### A. Arbeitsverfahren.

Für die Austestung des Penicillin-Wirkungswertes ist neben der bereits durch FLEMING angewandten Methode der Verdünnungsreihe besonders von der Oxford-Gruppe (ABRAHAM, CHAIN, FLOREY, HEATLEY und den Amerikanern COGHILL, SCHMIDT, MOYER), das Diffusionsplattentestverfahren angewendet worden. Beide Testmethoden beruhen auf der bakteriostatischen Wirksamkeit der Penicillin-Lösung bis zu einem bestimmten Verdünnungswerte. Beide Testmethoden arbeiten bei der Optimaltemperatur des Staphylokokken-Wachstums von 37° C und liefern das Testergebnis nach etwa 20—22 Std. Um den Wirkungswert des von den Mikrokulturen gebildeten Penicillins vollwertig im Testverfahren zu erfassen, war es jedoch notwendig, bei der optimalen Bildungstemperatur des Wirkstoffes bei 24° C zu bleiben, da bei einer Arbeitstemperatur von 37° C die zu testenden Mikrokulturen in ihrer physiologischen Tätigkeit während eines mehrtägigen Aufenthaltes vollkommen gehemmt worden wären.

### B. Bestimmungsmöglichkeiten des antibiotischen Wertes von Einsporen-Mikrokulturen im Diffusionsplattenverfahren.

Wir haben eine Reihe von Verfahren auf ihre Brauchbarkeit hin untersucht, den antibiotischen Wert von Mikrokulturen mit Hilfe von Diffusionsplatten zu er testen.

#### a) *Staphylococcus aureus* SG 511 als Testkeim.

##### 1. Diffusionsplatte mit Trypsin-Pepton-Agar (Mikrokultur: Czapek-Dox-Agar).

Die Diffusionsplatten werden mit 15 ml Trypsin-Pepton-Agar in 100-mm-Petrischalen gegossen. In den Agar werden bei 45° C (Höppler-Thermostat) vor dem Ausgießen 3 Tropfen einer 24stündigen Kultur von *Staphylococcus aureus*

(mittlere Keimzahl 60 Mill. Keime) geimpft. Nach Erkalten der Testplatte wird die 8 Tage alte Mikrokultur (Czapek-Dox-Agar) mit Glasring zentrisch auf die Agaroberfläche der Testplatte gebracht. Diese Testplatten mit den darauf befindlichen Mikroulturen werden drei Tage bei 24° C gehalten. Die erste Durchmesserbestimmung der bakteriostatischen Hemmungsringe, deren Größe von dem Penicillinbildungsvermögen der Mikroulturen abhängig ist, kann bei Verwendung von Trypsin-Pepton-Agar erst am 3. Tage nach Aussetzen der Mikrokultur, d. h. an ihrem 11. Lebenstage, erfolgen, da der Rand der Diffusionsringe erst dann die genügende Schärfe aufweist.

Weiterhin wird alle 24 Std eine Durchmesserbestimmung des wachsenden Penicillin-Diffusionsringes, wie er in der wachsenden lytischen Vernichtungszone (Aufhellungszone) der Staphylokokken zum Ausdruck kommt, durchgeführt. Ein Vergleich der Werte dieser Durchmesserbestimmung ergibt die jeweils geeignetste Mikrokultur der Charge. Sie ist zu weiteren Abimpfungen bzw. Weiterzucht herangezogen worden, und aus ihrem Sporenmaterial werden weitere Einsporen-Tochterkulturen gewonnen, bei denen sich dieser Vorgang der abwechselnden Isolierung und Selektion wiederholt. Um von den jüngst erhaltenen höchstwertigen Mikroulturen ausreichende Mengen Sporenmaterial zur Beimpfung in Schrägröhrchen zu erhalten, wandten wir nachstehende Methode an.

In 60-mm-Petrischalen werden Coghill-Agar-Platten gegossen, auf die man nach dem Erkalten die Mikroulturen mit Agarstückchen (ohne Glasring) unter sterilen Bedingungen aufsetzt und anwachsen läßt. Man erhält so eine Zone erbgleichen Mycels und genügend Sporenmaterial, um eine größere Anzahl Schrägröhrchen zu beimpfen.

**Kritische Beurteilung des Diffusionsplattenverfahrens mit Trypsin-Pepton-Agar:** Die Trypsin-Pepton-Agar-Diffusionsplatte liefert zunächst unscharfe Diffusionsringe, die erst am 3. Expositionstag meßbar sind. Sie ist nur als langzeitliche Diffusionsplatte verwendbar. Diese Tatsache ermöglicht zwar einerseits die gesamte zur Wirkung kommende Penicillinmenge der getesteten Mikrokultur — allerdings als relativen Wert — zu erfassen und gleichzeitig die zeitliche Verteilung der Penicillin-Produktion als Testfaktor für die antibiotische Leistungsfähigkeit der Mikrokultur statistisch festzulegen (Abb. 1).

Doch ergibt sich bei längerer Meßzeit ein zunehmendes Verblässen des Staphylokokken-Schleiers, zudem muß eine Verarmung des Mikro-



Abb. 1. Durchmesser des Diffusionsringes als Funktion der Expositionszeit in der langzeitlichen Diffusionsplatte. E 527 antibiotisch hoch wirksamer Stamm (frühe Erreichung hoher Diffusionswerte). E 501 antibiotisch mittelmäßiger Stamm (späte Erreichung hoher Diffusionswerte).

kultur-Nährbodens durch Diffusion in die Agarplatte, sowie eine Beeinflussung der Mikrokultur durch den Pepton-Agar angenommen werden. Ungünstig wirkt sich auch die Bestreuung der Platte mit Eigensporen und Fremdkeimen in längerer Expositionszeit aus. Als wesentliches Passivum der Methode wäre anzuführen, daß das Verfahren keinen Standardvergleich durch parallele Applizierung im Mikroglasring ermöglicht, da hierbei nur die bakteriostatische Hemmungszone nach 24 Std meßbar ist. Das Arbeitsverfahren gestattet daher nur eine relative Wertbestimmung, deren Abhängigkeit von Resistenzschwankungen des Testkeimes und anderen Faktoren unkontrollierbar ist.

## 2. Diffusionsplatte mit Dextrose-Trypsin-Pepton-Agar (Mikrokultur: Czapek-Dox-Agar).

Der Ansatz der Platten erfolgt in gleicher Weise, wie bei den Trypsin-Pepton-Agar-Platten näher ausgeführt.

Tabelle 3. Beispiel der Diffusionsring-Durchmesserwerte von Einsporen-Mikrokulturen auf kurzzeitigen (24 Std) Diffusionsplatten. Teststamm: *Bacillus subtilis* Michigan SG 119. T = 24° C. Mikrokultur und Platte: Czapek-Dox-Agar.

Lfd. Nr.	Stamm	Kulturtag							
		5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
1325	A 1990	28	28	29	30	28	30	32	32
1326		25	27	28	29	27	29	31	30
1327		22	27	25	26	26	28	30	29
1328		22	26	30	32	27	30	32	31
1329		24	27	29	30	26	30	32	30
1330		21	24	29	30	25	27	31	29
1331		19	24	28	30	27	30	30	31
1333		19	26	29	30	28	29	32	31
1334	P 63	23	26	31	32	26	24	24	
1335		25	28	30	30	25	23	24	
1337		22	26	30	29	20	30	32	
1338		20	26	31	30	32	31	33	
1339	P 64	14	22	27	26	27	26	33	
1340		18	27	31	30	32	34	33	
1341		18	26	30	30	32	32	31	
1342		20	27	31	30	33	34	33	
1344	E 1048	19	26	30	28	31	33	33	
1345		25	28	31	27	30	33	33	
1346		24	29	30	26	29	31	31	
1347		24	30	29	28	32	32	32	
1348		23	28	28	27	30	31	32	
1349		24	28	28	32	33	33	32	
1350		24	27	31	27	27	29	28	
1351		16	25	30	32	31	33	32	
1352		19	27	30	31	31	32	32	
1353		23	26	27	30	29	31	31	



Tabelle 4. Wertskala sowie täglicher und laufender Schwankungsbereich des Diffusionsringdurchmessers von *Bacillus subtilis*-Platten bei Applizierung von Penicillin-Standardlösung steigender Konzentration auf kurzzeitigen (24 Std) Diffusionsplatten.  
 T = 24° C. Nährboden: Czapek-Dox-Agar.

Penicillin-Konzentration IE/ml	Diffusionsringdurchmesser in mm				
	10. 6.	11. 6.	12. 6.	13. 6.	14. 6.
0,5	24	23	24	26	26
	24	22	24	26	26
	24	22	25	26	26
	24	22	24	25	26
0,75	26	24	26	28	26
	25	23	26	28	26
	25	24	27	27	27
	25	24	26	28	26
1,0	28	25	28	28	27
	27	25	29	28	27
	27	24	28	29	27
	27	25	28	28	27
1,5	28	26	28	29	30
	28	27	27	29	29
	28	26	27	29	29
	28	27	28	28	29
2	29	27	28	30	29
	29	27	28	30	29
	29	28	27	31	28
	29	27	28	30	28
3	30	30	31	31	31
	30	30	29	30	32
	30	30	30	32	31
	30	30	30	30	31
6	31	32	32	34	33
	31	32	30	33	35
	31	32	32	32	34
	31	32	32	33	34

Kritische Beurteilung des Verfahrens mit Dextrose-Trypsin-Pepton-Agar: Die Dextrose-Trypsin-Pepton-Agar-Platte gestattet auf Grund der scharfen Ausbildung der zunächst bakterio-statischen Diffusionsringe bereits nach 24 Std die erste Messung und kann somit als kurzfristige Diffusionsplatte mit Standardvergleich (0,1 ml Penicillin-Standardlösung je Mikro-Glasring) Verwendung finden, doch erfaßt die kurzzeitige Diffusionsplatte, streng genommen, nur einen kleinen Ausschnitt (24 Std) des physiologischen Zyklus der

Penicillin-Bildung. Man wird daher vorteilhafter die Dextrose-Trypsin-Pepton-Agar-Platte als langzeitliche (bakteriolytische) Diffusionsplatte mit bakteriostatischem Standardvergleich am ersten Tag anwenden. Doch muß dann die Exposition der Mikrokultur bereits am 4. Tag erfolgen, um niedrige Aktivitätswerte zu erhalten, die noch im Bereich der Standard-Vergleichsmöglichkeiten liegen (vgl. Tab. 3 u. 4). Hinsichtlich der Verarmung des Mikrokultur-Nährbodens durch Diffusion in die Agarplatte gilt das gleiche wie es bereits bei der Trypsin-Pepton-Agar-Platte ausgeführt worden ist. Hinzu kommt die unerwünschte Beeinflussung der Mikrokultur durch das Pepton der Diffusionsplatte sowie durch die Dextrose. Als positiv zu werten ist die Stabilität des Staphylokokkenschleiers. Unerwünscht ist auch hier die Bestreuung der Platte mit Eigensporen und Fremdkeimen bei längerer Expositionszeit (Gefahr des Unsterilwerdens der Mikrokultur!) und das kräftige Anwachsen der Streukeime mit dadurch bedingter Störung bzw. sogar Unlesbarwerden des Diffusionsringes.

### 3. Diffusionsplatte mit Czapek-Dox- bzw. Coghill-Agar (Mikrokultur: Czapek-Dox-Agar).

Dieses Verfahren in der langzeitlichen Diffusionsplatte würde ein Auswachsen der Mikrokultur und damit sekundäre Aktivität bedingen.

#### b) *Bacillus subtilis* Michigan SG 113 als Testkeim.

*Bacillus subtilis* züchteten wir in achttägiger 25 ml-Schüttel-Kultur in 50 ml-Kulturkölbchen bei 24° C. Nach Beendigung des Anwachsens pasteurisierten wir das Material. Von jedem Kultur-Kölbchen wird zweckmäßig eine Probeplatte gegossen zur Feststellung der geeigneten Keimdichte, indem drei Tropfen der Kulturlösung vor dem Ausgießen des Agars in die sterile Petrischale gebracht werden. Die Kölbchen, deren Probeplatten geeignete Keimdichte aufweisen, werden vereinigt und die Sporen-Aufschwemmung im Kühlschrank als Testmaterial aufbewahrt.

### 1. Diffusionsplatte mit Trypsin-Pepton-Agar bzw. Dextrose-Trypsin-Pepton-Agar.

Kritische Beurteilung des Verfahrens: *Bacillus subtilis* gibt auf allen Nährböden, die zur Verwendung kommen können, scharfe bakteriostatische Diffusionsringe durch Keimungshemmung der Sporen. Hieraus ergibt sich von selbst, daß das Verfahren nur für die kurzzeitige 24 Std-Diffusionsplatte möglich ist. Damit ist auch der laufende Standardvergleich gegeben. Will man sich andererseits nicht mit dem einmaligen Aussetzen und dem kurzfristigen Test begnügen, so muß man bei wiederholtem Aussetzen — abgesehen von dem großen Materialaufwand — eine Verarmung des Mikrokultur-Nährbodens in

Kauf nehmen, sowie eine gleichzeitige Beeinflussung der Mikrokultur durch Pepton-Agar und Dextrose der Diffusionsplatte.

## 2. Diffusionsplatte mit Czapek-Dox-Agar (Mikrokultur: Czapek-Dox-Agar).

Das Verfahren wäre im allgemeinen so zu beurteilen wie das vorangegangene, nur mit dem Unterschied, daß bei laufender Aussetzung keine Verarmung sondern eine Auffrischung des Mikrokultur-Nährbodens durch Diffusion aus den frischen Czapek-Dox-Agar-Platten erfolgt; verbunden allerdings mit einer Verlängerung der Wachstumsperiode und damit der Testzeit. Der Einfluß eines andersartigen Nährbodens ist nicht vorhanden.

Trotz vieler Vorteile wäre als Meßergebnis mit der kurzfristigen 24 Std.-Diffusionsplatte mit *Bacillus subtilis* als Testkeim bei laufendem täglichen Aussetzen festzustellen: Gemessen am Standardvergleich ist die tägliche zur Auswirkung kommende antibiotische Aktivität so groß, daß selbst bei früher Exposition (5. Tag) die Meßwerte in einem Bereich liegen, in welchem große Aktivitätsunterschiede nur geringe Unterschiede der Diffusionsringdurchmesser ergeben; zudem liegt die Variation ihrer Größenordnung innerhalb der Schwankungsbreite der Standardwerte bzw. der durch die Keimzahlschwankungen der Platten sich ergebenden Differenzen (Tab. 3 u. 4).

Bei täglicher Messung lassen sich keine ausgesprochenen einheitlichen Optimaltage festlegen, an denen eine kurzzeitige einmalige Messung angebracht wäre. Die Spitzenwerte der Aktivität, auf die es bei der Selektion ankommt, werden verflacht bzw. abgeschnitten. Es ist nur eine allgemeine Auslese im Sinne einer Anreicherung des qualifizierteren Materials möglich. Eine direkte Linie der Aufwärtsentwicklung auf Grund der Auswahl extrem positiver Variationen läßt sich mit diesem Arbeitsverfahren nicht durchführen. Bei einer Verwendung der Methode für einen Testvergleich wäre ein hoher Material- und Arbeitsaufwand notwendig, der nach obigen Feststellungen in keinem Verhältnis zur Genauigkeit steht.

## 3. Diffusionsplatten mit Coghill-Agar (Mikrokultur: Coghill-Agar).

Hinsichtlich der kritischen Beurteilung des Verfahrens wäre das gleiche zu sagen wie bei der vorangegangenen Methode. Erwähnenswert wäre außerdem, daß die tägliche Aktivität im Verhältnis zur Diffusionsringgröße (infolge geringerer Penicillinbildung auf Coghill-Agar) günstiger ist als bei Verwendung von Czapek-Dox-Agar für die Mikrokultur (vgl. Tab. 5).

Nach den Ergebnissen von Verdünnungsreihen-Testen ist jedoch eine Vergleichbarkeit der Penicillin-Bildungsverhältnisse des gleichen Stamms



bei Kultivierung auf Czapek-Dox einerseits — auf Coghill-Nährboden andererseits — nicht möglich. Spitzenwerte des Penicillin-Bildungsvermögens kommen auf Coghill-Nährboden nicht zum Ausdruck (Tab. 5).

Tabelle 5. Vergleich des Penicillin-Bildungswertes auf Czapek-Dox- und Coghill-Nährlösung in 50-ml-Kulturkölbchen. 15. Kulturtag.

A 3338		A 3272		A 1434		A 3725	
Czapek-Dox	Coghill	Czapek-Dox	Coghill	Czapek-Dox	Coghill	Czapek-Dox	Coghill
86 IE	44 IE	95 IE	44 IE	71 IE	44 IE	71 IE	31 IE
86 IE	44 IE	95 IE	44 IE	71 IE	44 IE	71 IE	31 IE
77 IE	32 IE	77 IE	44 IE	71 IE	44 IE	71 IE	31 IE
77 IE	32 IE	77 IE	32 IE	71 IE	32 IE	71 IE	31 IE
72 IE	32 IE	77 IE	32 IE	71 IE	32 IE	63 IE	31 IE
72 IE	32 IE	72 IE	32 IE	63 IE	32 IE	63 IE	31 IE
	32 IE		32 IE	63 IE	32 IE	63 IE	31 IE
	32 IE		32 IE	63 IE	32 IE	63 IE	
			32 IE	63 IE	32 IE	63 IE	
				42 IE		63 IE	
				42 IE			

### C. Allgemeine Beurteilung des Diffusionsplatten-Testverfahrens für die Brauchbarkeit in der antibiotischen Selektion.

Die Diffusionsplatte im langzeitlichen (bakteriolytischen) Verfahren mit *Staphylococcus aureus* als Testkeim, speziell auf Dextrose-Trypsin-Pepton-Agar, ist für die relative antibiotische Wertbestimmung geeignet, soweit es sich nicht darum handelt, Spitzenwerte der Aktivität festzustellen, sondern im Rahmen einer antibiotischen Vorselektion aus einem Material mittlerer Aktivität auf breiter Basis geeignete antibiotische Stämme auszuwählen bzw. eine quantitative Anreicherung des qualifizierten antibiotischen Materials vorzunehmen. Die Diffusionsplatte überhaupt gestattet mithin nur eine allgemeine antibiotische Auslese. Spitzenwerte auf Grund von Variationen, auf denen man eine Höherentwicklung eines Pilzstammes aufbauen könnte, sind nicht ertestbar, denn im Bereich hoher Aktivität entsprechen

Tabelle 6. Aktivitätsunterschiede und Diffusionsringdurchmesser in der kurzzeitigen (24 Std) Diffusionsplatte. T = 37° C. Teststamm: *Staphylococcus aureus* SG 511.

Standardwert in IE	Testbarkeit	Diffusionsring ø mm	Mittelwerte mm
0,5	testbarer	16, 17, 15, 18, 17	16,6
1,5	Bereich	22, 22, 23, 21, 21	21,8
3	Grenzbereich	28, 28, 25, 28	27,3
15	nicht testbarer	28, 28	28,0
150	Bereich	30, 31	30,5

großen Aktivitätsunterschieden nur noch verhältnismäßig geringe oder gar keine Diffusionsunterschiede (COGHILL), (KNÖLL), (Tab. 6).

Früher von uns durchgeführte unveröffentlichte Untersuchungen über den Gaswechsel von *Staphylococcus aureus* SG 511 unter Einfluß verschieden hoher Penicillindosen haben zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich eines oberen Schwellenwertes der Testbarkeit geführt (Tab. 7).

Tabelle 7. Relativer O<sub>2</sub>-Verbrauch von Staphylokokkenkulturen  
(24 Std Pepton-Wasser-Kultur 1:3 verdünnt)  
nach 140 min Einwirkung von Penicillin-Standardlösung.

Penicillin-Dosis	Relativer O <sub>2</sub> -Verbrauch (gemessen mit Warburg-Manometern 140—160 min nach Applizierung des Penicillins. Versuchstemperatur 37° C)	
ohne Penicillin	100	
0,01 IE	89	Für Testzwecke geeigneter Bereich, Quotientunterschiede genügend groß
0,02 IE	76	
0,04 IE	54	
0,08 IE	27	
0,16 IE	20	Für Testzwecke wenig brauchbarer Bereich, Quotientunterschiede liegen innerhalb der Fehlergrenze der Methode
0,32 IE	15	
0,64 IE	12	
1,28 IE	7	

Auf den Diffusionsring-Durchmesser haben eine Reihe teils kontrollierbarer, teils unkontrollierbarer Faktoren Einfluß. Ein solcher Faktor ist die Agar-Konzentration (Tab. 8). Andere sind die Resistenzschwan-

Tabelle 8. Abhängigkeit des Diffusionsringdurchmessers von der Agarkonzentration der Diffusionsplatte.

Pepton-Agar-Konzentration	Penicillin IE	Durchmesser der Diffusionsringe nach 24 Std bei 37°	Mittelwerte
1,5%	1,5	20, 23, 23, 24, 23 mm	22,6 mm
1,75%	1,5	24, 23, 24, 24, 24 mm	23,8 mm
2,0%	1,5	24, 25, 24, 25, 25 mm	24,6 mm
2,25%	1,5	25, 25, 25, 25, 24 mm	24,8 mm
2,5%	1,5	24, 25, 25, 25, 27 mm	25,2 mm

Tabelle 9. Beispiel einer zeitweiligen extremen, nährbodenbedingten Resistenzschwankung des Testkeimes *Staphylococcus aureus* SG 511 gegen Standard-Penicillin.

Normalresistenz . . . F = 1	9. 5. . . . . F = 2,0
26. 4.—30. 4. . . . F = 1,2	10. 5.—13. 5. . . . F = 1,75
1. 5.— 2. 5. . . . F = 1,4	14. 5. . . . . F = 1,4
3. 5.— 7. 5. . . . F = 1,75	15. 5. . . . . F = 1,16

kungen des Testkeimes (Tab. 9), die trotz der möglichen Errechnung eines Kompensationsfaktors infolge der Nichtanwendbarkeit des Standardvergleichs, zumindest für die Trypsin-Pepton-Agarplatte, nicht eliminierbar sind.

SCHMIDT und MOYER führen als weitere Fehlerquellen für den Diffusionsplatten-Test an: Dicke der Agarschicht, die Mutterkultur des Testkeimes (Alter, Art der Aufbewahrung usw.), pH der Nährlösung, das Verhältnis zwischen der Geschwindigkeit der Penicillindiffusion und dem Wachstum des Versuchsorganismus, die Konzentrationsunterschiede des Testkeimes und schließlich der Zustand der Oberfläche der Glaszylinder.

Die quantitative Auswirkung obiger Störungsfaktoren kann insbesondere in hoher Aktivität stärker sein, als der Einfluß der Unterschiede der letzteren.

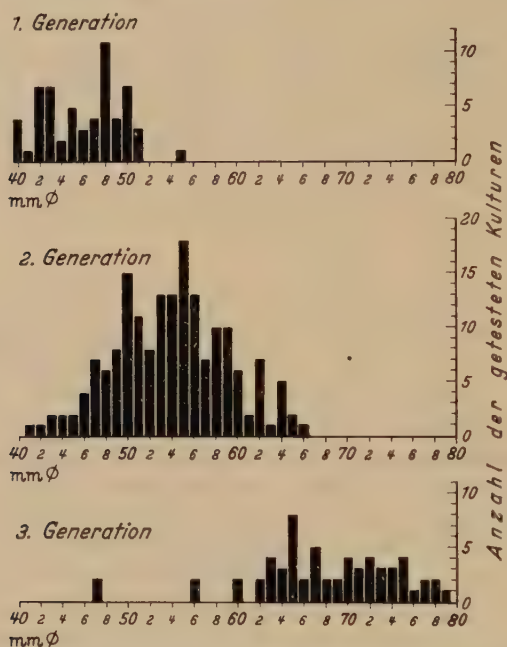


Abb. 2. Ergebnis des Selektionsverfahrens mit Einsporen-Mikrokulturen auf der Basis des Diffusionsplatten-Testes. Stamm SGP 23 (*Penicillium notatum*). Endwerte der Diffusion.

#### D. Arbeitsergebnis mit Hilfe des Diffusionsplatten-Testverfahrens.

##### a) Einsporenselktion.

Mit Hilfe der Einsporen-Isolierung und des Diffusionsplatten-Testes auf Trypsin-Pepton-Agar (Dextrose stand nicht zur Verfügung) konnte durch eine entsprechende Selektion von etwa 1000 Kulturen, die sich über eine Reihe von Generationen (von Konidie zu Konidie gerechnet) erstreckte, eine Anzahl hochwertiger Einsporen-Tochterstämme des Stammes SPG23 erhalten werden, die in der Produktion im Durchschnitt 70, mit ihren Spitzenwerten bis zu 80 IE lieferten. Die Steigerung der antibiotischen Wirksamkeit innerhalb von drei Generationen in relativen Diffusionswerten ist aus dem Diagramm zu ersehen (Abb. 2).



Nachdem die obengenannten Stämme eine Zeitlang in der Produktion gewesen waren und somit eine Reihe von Passagen bzw. von Überimpfungen geführt worden waren, zeigte sich zum wiederholten Male ein allmähliches Absinken ihrer Aktivität bzw. ein Schwanken der einzelnen Ergebnisse der Testung. Aus diesen Feststellungen ist der Schluß zu ziehen, daß es nicht allein genügt, einen erbeinheitlichen antibiotisch hochwertigen Stamm mit Hilfe der Einsporenmethode zu erhalten, son-

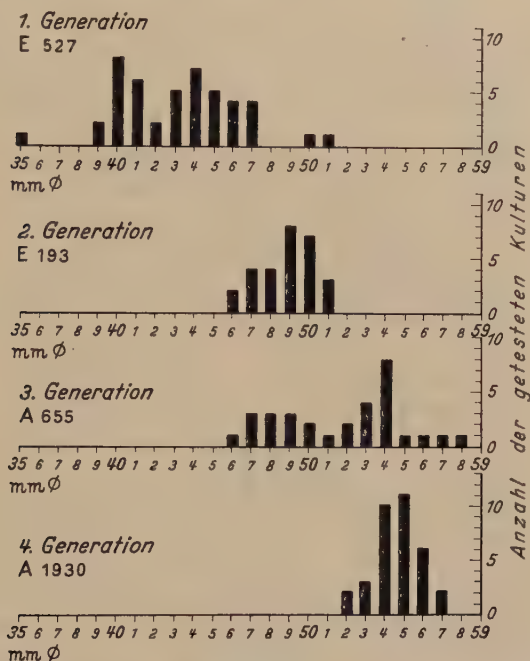


Abb. 3. Ergebnis des Selektionsverfahrens mit Punktimpfungs-Mikrokulturen auf der Basis des Diffusionsplattentestes. Stamm E 527. 11. Tag.

dern daß es notwendig ist, diesen Stamm selektiv weiterzupflegen. Den oben genannten Erkenntnissen entsprechend sind nachstehende Arbeiten durchgeführt worden:

#### b) Selektion auf Punktimpfungsbasis.

Da eine Weiterführung der Einsporen-Isolierung aus äußeren Gründen zeitweise nicht möglich war, ist eine vereinfachte Arbeitsmethode entwickelt worden, um die laufende Selektion des vorhandenen Materials durchführen zu können. Der Vorteil dieser Arbeitsart war die ohne große Mühe erreichbare hohe Anzahl von Einzelkulturen und damit mögliche breite Selektionsbasis. Das Instrument, mit dessen Hilfe die Punktimpfungen

vorgenommen wurden, war die gleiche Mikro-Glasnadel, wie sie für die Einsporen-Isolierung Verwendung gefunden hatte. Der Unterschied in der Arbeitsweise war nur der, daß nicht Einzelsporen, sondern verhältnismäßig geringe, durch die Kleinheit der Mikroglaskugel begrenzte Mengen von Sporen unter der Lupe zur Abimpfung gelangten. Hiernach applizierten wir die abgebrochene Mikroglasnadel in der gleichen Weise

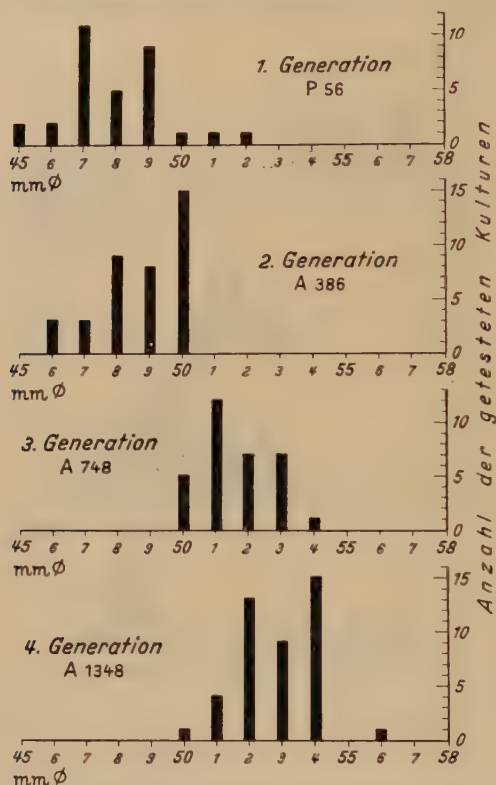


Abb. 4. Ergebnis des Selektionsverfahrens mit Punktimpfungs-Mikrokulturen auf der Basis des Diffusionsplattentestes. Stamm P 56. 11. Tag.

wie bei der Einsporen-Isolierung; auch die Testung der aus der Punktimpfung erwachsenen Mikrokultur war die gleiche wie bei dieser Methode.

Die Punktimpfung gewährleistet zwar keine qualitativ jedoch eine quantitativ einheitliche Abimpfung der Testkulturen. Auf Grund ihres Ursprungs aus einem Impfpunkt waren die dabei entstandenen Mycelinseln hinsichtlich ihrer morphologischen Ausbildung einheitlich. Die antibiotische Aktivität der Mikrokulturen war abhängig von dem Mittelwert der antibiotischen Qualität der verhältnismäßig geringen Anzahl

abgeimpfter Sporen, die — zwar erb-einheitlichen Ursprungs (Einsporenstamm) — im Einzelnen jedoch durch Umwelteinflüsse in ihrem antibiotischen Wert modifiziert worden waren.

Auf diese Weise sind mehrere tausend Mikrokulturen angelegt worden. Das Ergebnis der dabei durchgeführten Wertbestimmungen zeigte ein erhebliches Schwanken der Aktivität der einzelnen Mikrokulturen entsprechend der mehr oder minder weit fortgeschrittenen „Ermüdung“ des Materials. Die in 4 Generationen durchgeführte Selektionsarbeit ergab trotz der relativen Testmethode eine qualitative antibiotische Anreicherung des Materials, wie sie von mehreren Linien in den Tabellen niedergelegt ist (Abb. 3 u. 4).

Zur Prüfung der Realität der Diffusionsring-Werte setzten wir von angewachsenen Punktimpfungs-Mikrokulturen des Stammes *E 527* vergleichende Versuchsreihen als Oberflächenkulturen in 50 ml-Kulturkölbchen (25 ml Czapek-Dox) an und verglichen ihre Testergebnisse im Verdünnungsreihen-Verfahren mit den Diffusionswerten parallellaufender Schwesterkulturen. Im einzelnen gestalteten wir die Arbeit in der Weise, daß die nach der oben näher beschriebenen Art gewonnenen Sporen der auf 60 mm-Agarplatte angewachsenen hochwertigen Mikrokulturen möglichst quantitativ auf etwa 40 Stück Kulturkölbchen je Mikrokultur geimpft wurden und die Testung der flüssigen Kulturen an einem Optimaltag — charakterisiert durch den  $p_H$ -Wert 7,5 (15. Kulturtag) — in einer kurzen einmaligen Verdünnungsreihe erfolgte. Aus den Testergebnissen der flüssigen Kulturen im Verdünnungsreihenverfahren und den Punktimpfungs-Mikrokulturen gleichen Ursprungs im Diffusionsplatten-Verfahren ist eine relative Vergleichbarkeit der Testergebnisse der beiden Methoden feststellbar (Tab. 10). Ein absoluter Gleichlauf von Diffusionsplatten-Werten und Verdünnungsreihen-Ergebnissen kann nach den vorstehenden Untersuchungsergebnissen natürlich nicht angenommen werden.

Es sind auf diese Weise die aus dem Material des Stammes *E 527* im Diffusionsplattentest selektierten hochwertigen Mikrokulturen auf 50 ml-Kulturkölbchen geimpft und im Verdünnungsreihen-Test in der oben näher beschriebenen Weise geprüft worden. Bei dem hochwertigen selektierten Material lag der Durchschnitt der Aktivität im Oberflächenverfahren bei 72 IE, die Spitzenwerte bei 88 IE. Das bedeutet, daß mit Hilfe des Punktimpfungs-Selektionsverfahrens im Diffusionsplattentest die Ausgangsqualität des ursprünglichen Einsporenstammes *E 527* wieder erreicht worden ist bzw. die in der praktischen Weiterzucht aufgetretene Degenerationserscheinung durch die Selektion rückgängig gemacht werden konnte.



Tabelle 10. Vergleich der Selektions-Prüfungsergebnisse von Punktimpfungsmikrokulturen im Diffusionsplattentest und ihrer Tochterkulturen von 50 ml-Kulturkölbchen im Verdünnungsreihentest.

Selektions-Nr.	Anzahl der Platten mit Diffusionsring-Durchmesser in mm (11. Tag)											
	58	57	56	55	54	53	52	51	50	49	48	47 mm Ø
A 603			1	6	15	4	5	2	1			
A 590		2	7	7	7	5	1					
A 655	1	1	1	1	10	4	2	1	2	3	3	3
A 609			1	9	14	2	1					
A 593			1	2	9	13	5	2				
A 650	1		4	4	6	4	9	3				
A 643						1	4	9	5	7	1	
A 642								7	1	10	1	
A 637							2	1	3	2	4	

Selektions-Nr.	Anzahl der Kölbchen mit Aktivität in IE (15. Tag)					
	87	71	63	54	44	32 IE
A 603	1	14	6	2		
A 590		13	9			
A 655		11	9	3	1	1
A 609	1	8	6	8		
A 593		8	5	4		1
A 650		5	10	8		
A 643		5	6	6	6	
A 642		2	21	8		
A 637		5	9	14	2	

Die Methode des Selektionsverfahrens mit Hilfe von Punktimpfungsmikrokulturen mit Diffusionsplattentest auf der Basis erbreinen Ausgangsmaterials ermöglicht nach den vorliegenden Ergebnissen eine Hebung der Aktivität des Stammes, der durch Degeneration abzusinken droht, auf ihr Ausgangsniveau unter gleichzeitiger Einengung des Streubereiches der antibiotischen Werte der Einzelkulturen. Die Wertbestimmungsmöglichkeit ist jedoch nur eine relative. Das von den angewachsenen und selektierten Mikrokulturen abgeimpfte Material muß daher in flüssigen Kulturen laufend Kontrollprüfungen im Verdünnungsreihenverfahren unterzogen werden, um seinen absoluten Aktivitätswert festzustellen.

Außer für die Anwendung zur antibiotischen Konstanthaltung des Stammmaterials eignet sich das Verfahren zur Vor-Auswahl eines geeigneten Produktionsstammes aus einer Anzahl antibiotisch wirksamer Stämme, wie das Beispiel eines Vergleichs von drei Stämmen *Penicillium notatum* und zwei Stämmen *Penicillium chrysogenum* zeigt (Abb. 5).

*E. Bestimmungsmöglichkeiten des antibiotischen Wertes von Einsporen-Mikrokulturen im Verdünnungsreihenverfahren.*

Das Endziel einer laufenden antibiotischen Selektion sollte nicht nur die Konstanzhaltung der antibiotischen Aktivität des bearbeiteten Stammes sein, vielmehr wird versucht, antibiotische Spitzenleistungen

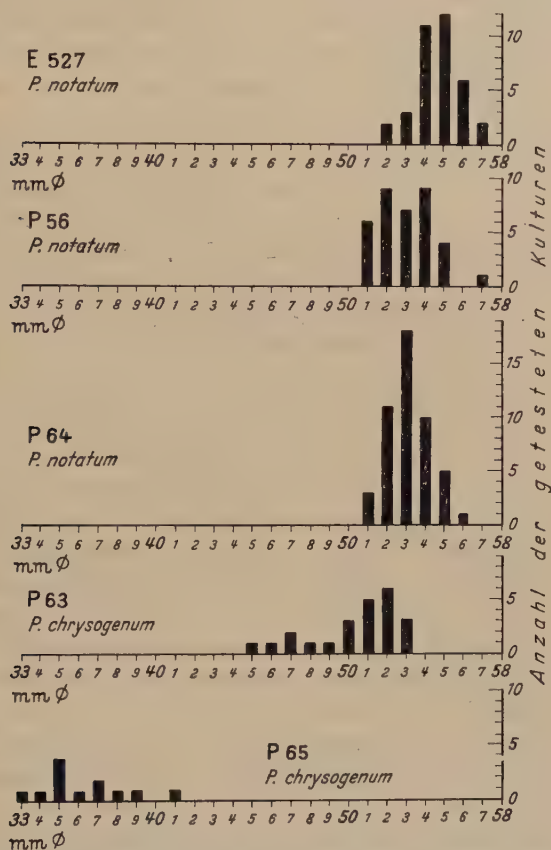


Abb. 5. Durchmesser der Diffusionsringe von Punktimpfungs-Mikrokulturen der Stämme E 527, P 56, P 63, P 64 und P 65. 11. Tag.

von Einsporen-Mikrokulturen, die als extreme positive Variationen auftreten, testmäßig in ihrem absoluten Wert zu erfassen und züchterisch weiter zu verfolgen, zur Feststellung der Erbkonstanz ihrer antibiotischen Fähigkeit.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kommt die Selektion auf Punktimpfungsbasis für die Ertestung von antibiotischen Spitzenwerten modifikativer bzw. mutativer Art nicht in Frage, da man nicht

mit monophyletischen reinen Linien sondern mit polyphyletischem, gemischten Material arbeitet. Positive antibiotische Variationen einzelner Sporen würden durch den unveränderten antibiotischen Phänotypus des Tochtermycels eines großen Teils der übrigen Sporen des gleichen Impfpunktes überdeckt werden. Antibiotische Sonderleistungen einer oder weniger variierten Sporen könnten sich nur in einem geringen vegetativen Anteil der Kultur entfalten. Nur bei Einsporen-Kulturen können sich Variationen der antibiotischen Aktivität der Einzelspore im Falle von Spitzenwerten ungestört auswirken, da das gesamte Tochtermycel einheitlichen Ursprungs ist.

Hinsichtlich der Möglichkeit der Ertestung antibiotischer Spitzenwerte muß nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen über das Arbeitsverfahren der Diffusionsplatte ersichtlich werden, daß dieses Verfahren keine entsprechenden Möglichkeiten bietet. Hierfür ist allein die Verdünnungsreihe als Testverfahren brauchbar, und zwar in einer Form, die die Testung hoher Aktivitätswerte ohne große Verdünnungsfehler gestattet.

#### a) Technik der Selektion auf Spitzenwerte der Aktivität im Oberflächenverfahren.

Die Abimpfung der isolierten Einzelsporen erfolgt wie üblich auf standardisierte Agarmengen in entsprechenden Mikroglasringen; vorteilhafterweise wird hierfür Czapek-Dox-Agar mit Bierhefehydrolysat verwendet, da auf demselben die günstigste Keimungsrate erreichbar ist. Außerdem sind Infektionen durch Pilzfremdsporen auf diesem Nährboden leicht erkennbar. Mit den angewachsenen unter sterilen Bedingungen halbierten Mikrokulturen beimpfen wir 100 ml-Kölbehen mit 50 ml Czapek-Dox-Kulturlösung.

Die Kölbehen, die durch Kapsenberg-Kappen (in von uns abgewandelter Form) verschlossen sind, werden nach Einbringung der halben Mikrokulturen 30 min auf einer Schüttelmaschine geschüttelt. Die Mikrokultur streut ihre reifen Konidien während des Schüttelns in die umgebende Kulturflüssigkeit und es bildet sich auf derselben recht bald bei einer Bebrütung bei 24° C eine geschlossene Myzeldecke, insbesondere, wenn der Czapek-Dox-Lösung Bierhefe-Hydrolysat als Wachstumsstoff zugefügt wird. Die aus der Mikrokultur und damit aus der Einzelspore erwachsenen Oberflächenkulturen werden bei Erreichung des pH-Wertes 7,5 am 15. Kulturtag, dem Reifetag der Kultur, in der Verdünnungsreihe in Doppelbestimmung auf ihre antibiotische Aktivität geprüft (siehe Tab. 11). Es empfiehlt sich nicht, das Sporenmaterial hochwertiger flüssiger Kulturen zur Beimpfung von Schrägagarröhrchen zu verwenden, denn diese Art der Weitergabe bewirkt eine Abwertung des Materials (Tab. 17).

Es werden daher die Schwesterhälften der ausgeimpften Mikrokulturen, deren Sonderleistungen festgestellt sind und die in sterilen Glasröhrchen bei +2° bis +3° C aufbewahrt worden sind, zur Beimpfung eines



Stammröhrchens (Bierwürze-Schrägar) verwendet. Durch diese Methode ist eine direkte Weitergabe des hochwertigen Einsporen-Materials über geeignete Nährböden gesichert.

Tabelle 11. *Beispiel der Entwicklung der Aktivität in 50 ml-Kulturkölbchen bis zum Reifetag (15. Kulturtag).*

Kulturtag	Stamm A 1993	Stamm A 2000	Stamm A 2014
11. Tag . . . .	44, 44, 44, 44	32, 32, 44, 32	44, 44, 44, 44 IE
12. Tag . . . .	44, 54, 54, 54	44, 44, 54, 54	44, 44, 44, 63 IE
13. Tag . . . .	63, 63, 63, 63	63, 71, 71, 71	63, 63, 63, 63 IE
14. Tag . . . .	71, 71, 71, 87	63, 71, 71, 71	71, 71, 71, 87 IE
15. Tag . . . .	87, 87, 87, 87	87, 87, 87, 87	87, 87, 87 IE

#### b) Technik der Selektion auf Spitzenwerte der Aktivität im submersen Verfahren.

Die Erzüchtung der Einsporen-Mikrokulturen erfolgt für das submerse Verfahren in der gleichen Weise wie für das Oberflächenverfahren.

Als Kulturgefäße für das submerse Verfahren verwendeten wir zunächst mit Druckluft über Jenaer G3-Luftfilter belüftete 250 ml-Kulturkölbchen (100 ml Czapek-Dox). Die Druckluft-Belüftung ermöglichte jedoch infolge ihrer Kompliziertheit (Luftleitung, Luftverteilung, Luftleitungs-Anschlüsse, Filter usw.) nicht die hohe Anzahl von Einzelkulturgefäßen, wie sie für ein laufendes Testverfahren der Selektionsarbeit nötig ist. Es waren bei 24 Kölbchen Fassungsvermögen der verwendeten Schüttelmaschine nur alle 10 Tage 24 Einzelwertbestimmungen möglich. Weiterhin gaben Belüftungsunterschiede unkontrollierbare Aktivitätsdifferenzen.

Daher erwies sich ein Übergang zu unkomplizierten unbelüfteten Kulturkölbchen als erforderlich, die in der notwendigen großen Anzahl verwendet werden können. Wir erprobten 50 ml, 100 ml und 200 ml-Kulturkölbchen. Die 50 ml-Kölbchen waren zu niedrig, so daß beim Schütteln hochgeschleudertes Mycel als Luftmycel die Öffnung des Halses allmählich verengte oder sogar verschloß. Die 200 ml-Kölbchen zeigten keinen genügenden Schütteleffekt, auch waren sie zu hoch und beeinflussten den Gasaustausch nachteilig. Die 100 ml-Kölbchen mit 30 ml Czapek-Dox-Lösung erwiesen sich als die geeignetsten, insbesondere in Erlenmeyer-Form.

Eine weitere Versuchsreihe bezog sich auf den geeigneten Kappenverschluß der zu verwendenden Kölbchen. Die zunächst benutzte Kapsenbergkappe gab eine zu ungleichmäßige und auch ungenügende Belüftung der Kölbchen. Wir ersetzten sie daher durch eine aus der Kapsenbergkappe entwickelte Wattekappe. Durch erhöhtes Aufsetzen der Kappe wurde ein Verschluß der Watteschicht und damit Störungen des Gasaustausches durch Bewachsen mit Luftmycel verhindert. Die oben näher beschriebenen Kölbchen für das submerse Kulturverfahren werden in einer Anzahl von etwa 400 Stück auf einer entsprechenden Schüttelmaschine mit

220 Schwingungen in der Minute bei 24° C nach ihrer Beimpfung acht Tage geschüttelt. Hierbei spielt die Gleichmäßigkeit der Schüttelfrequenz und Amplitude der Maschine eine wesentliche Rolle, denn von diesen Faktoren hängt die Flüssigkeitsoberfläche und damit der Gasaustausch ab, außerdem aber auch zu einem Teil die Größe der submersen Mycelkügelchen und damit deren Oberflächenverhältnis. Von letzterem andererseits ist die Entwicklung des pH-Wertes und die Penicillinbildung in gewissem Sinne abhängig.

Aus dem eben Gesagten ergibt sich, daß die Frequenz und Amplitude der Schüttelmaschine konstant bleiben muß, insbesondere bei wechselnder Belastung der Maschine.

Die antibiotische Aktivitätsprüfung der submersen Kulturkölbchen erfolgt am 8. Tage.

Eine direkte Weiterimpfung mit submerser Mycel aus flüssiger Kultur in eine neue submerse Kultur empfiehlt sich ebensowenig wie das direkte Überimpfen von flüssiger Deckenkultur auf eine flüssige Oberflächenkultur, da dieses Verfahren mit einer erheblichen Aktivitätsminderung verbunden ist (Tab. 12). Ebensowenig empfiehlt sich auch die direkte Abimpfung der submersen Kulturen auf Schrägagarröhrchen bzw. andere mit Agar beschickte Impfgefäße. Man geht zweckmäßig so vor, daß die Schwesterhälften der Mikrokulturen der hochwertigsten Kölben auf Bierwürze-Schrägar-Röhrchen (Stammröhrchen) abgeimpft werden.

Werden die Stammröhrchen nach 14tägiger Anwuchszeit nicht sofort verwendet, so müssen sie bei +2° bis +3° C aufbewahrt werden, da höhere Temperaturen bzw. Temperaturschwankungen sich physiologisch ungünstig auswirken (COGHILL).

Tabelle 12. Abnahme der Aktivität eines submersen Stammes bei Weiterimpfung von angewachsenem (8 Tage alten) Mycel.

Stamm	1. Generation	2. Generation	3. Generation
<i>S 1082</i>	87 IE	63 IE	44 IE
<i>S 1215</i>	87 IE	44 IE	
<i>S 1465</i>	87 IE	44 IE	
<i>S 1473</i>	87 IE	44 IE	
<i>S 1250</i>	87 IE	32 IE	

#### F. Ergebnis des Selektionsverfahrens mit Einsporen-Kulturen auf der Basis des Verdünnungsreihentestes.

Das biologische Material lieferte der Stamm *Penicillium notatum* SGP 64. Die antibiotische Voruntersuchung des Stammes in massiv beimpften 100 ml-Kölben ergab die Werte der Tab. 13.

Tabelle 13. Antibiotische Aktivität des Ausgangsstammes SGP 64

im Oberflächenverfahren	Aktivität . . . . .	54, 44, 32, 25, 17 IE
	Anzahl der Kölben . . .	1, 7, 13, 9, 4
im submersen Verfahren	Aktivität . . . . .	44, 32, 25, 17 IE
	Anzahl der Kölben . . .	5, 43, 17, 6

Die erreichten Werte der Aktivität liegen in beiden Verfahren annähernd gleich hoch (Durchschnittswert 32 IE). Das submerses Verfahren ermöglicht auf Grund seiner nur achttägigen Kulturperiode eine raschere Selektionsfolge. So sind die ersten Selektionsarbeiten auf Einsporenbasis mit Verdünnungsreihentest in diesem Verfahren durchgeführt worden.

Das Ergebnis des Prüfverfahrens an Einsporen-Mikrokulturen in submersen 100 ml-Kulturkölbchen (25 ml Czapek-Dox) auf der Basis des Verdünnungsreihentestes enthält (Tab. 14).

Tabelle 14. Antibiotische Aktivität von Einsporen-Kulturen. (1. Tochtergeneration.)

Aktivität . . . . .	63, 54, 44, 32 IE
Anzahl der Einsporenkulturen .	26, 32, 125, 183

Es war damit gelungen, aus dem Grundmaterial des Stammes *SGP 64*, der im Oberflächen- und im submersen Verfahren einen antibiotischen Durchschnittswert von etwa 32 IE besitzt, eine verhältnismäßig umfangreiche Gruppe von Einsporen-Kulturen zu erhalten, die eine antibiotische Wirksamkeit von 44 IE ergaben. Darüber hinaus tritt eine Gruppe mit einer gehobenen Aktivität von 54 IE hervor; und schließlich erscheint eine Spitzengruppe mit 63 IE antibiotischer Wirksamkeit. Die Seltenheit der hohen Aktivitätswerte hatte jedoch zur Folge, daß sie im antibiotischen Erscheinungsbild des Ausgangsstammes nicht in Erscheinung traten.

Die Prüfung der antibiotisch hochwertigen Einsporen-Tochterstämme (1. Tochter-Generation) des Stammes *Penicillium notatum SGP 64* auf die Erbkonstanz ihrer hohen antibiotischen Aktivität führten wir an einer erneuten Folge von Einsporen-Kulturen (2. Tochtergeneration) im submersen und im Oberflächenverfahren in 100 ml-Kölbchen durch. Bei dieser Prüfung, die gleichzeitig einen weiteren Selektionsschritt darstellte, erhielten wir zwei Gruppen von Stämmen, deren antibiotische Prüfwerte aus Tab. 15 ersichtlich sind.

Tabelle 15. Antibiotische Aktivität von Einsporenkulturen. (2. Tochtergeneration.)

<i>Stamm S 1815.</i>			
Aktivität . . . . .	75,	54,	32 IE
Anzahl der Einsporenkulturen (submerses Verfahren).	14,	26,	12
<i>Stamm S 1814.</i>			
Aktivität . . . . .	75, 63, 54, 44,	32 IE	
Anzahl der Einsporenkulturen (submerses Verfahren).	6, 35, 26, 10,	4	
<i>Stamm S 1207.</i>			
Aktivität . . . . .	84, 75, 63, 54, 44,	32 IE	
Anzahl der Einsporenkulturen (submerses Verfahren).	—, —, 5, 10, 13,	14	
Anzahl der Einsporenkulturen (Oberflächenverfahren).	1, 1, 22, —, —, —		
<i>Stamm S 1208.</i>			
Aktivität . . . . .	84, 75, 63, 54, 44,	32 IE	
Anzahl der Einsporenkulturen (submerses Verfahren).	—, —, —, 3, 9,	14	
Anzahl der Einsporenkulturen (Oberflächenverfahren).	2, 4, 44, —, —, —		



Als Prüfungsergebnis wäre festzustellen: Die antibiotische Wertigkeit der selektiv erhaltenen Einsporen-Stämme der 1. Tochtergeneration mit primär gleich hohen Prüfungsergebnissen spaltete in der 2. Tochtergeneration in verschiedener Weise auf.

1. Bei dem Stamm *S 1814* lag die größte Anzahl der geprüften Kulturen im submersen Verfahren bei einer gehobenen Aktivität von 63 IE (im Gegensatz zu 32 IE mittlerer Wertigkeit des Ausgangsstammes). Jenseits des Mittelwertes war ein zahlenmäßig sich verringender kontinuierlicher Abfall auf 32 IE festzustellen. Es erschienen neue Spitzenwerte mit 75 IE.

Bei dem Stamm *S 1815* lagen zunächst ähnliche Verhältnisse vor, wenn man berücksichtigt, daß die Wertstufen 44 IE und 63 IE aus technischen Gründen nicht zur Testung gelangten. Bemerkenswert ist jedoch, daß die Anzahl der neuen Spitzenwerte von 75 IE relativ und absolut wesentlich höher lag als bei *S 1814*. Das bedeutet, daß die Wahrscheinlichkeit, mit dem Stamm *S 1815* hohe Produktionswerte im submersen Verfahren zu erlangen, größer ist, als bei dem Stamm *S 1814*. Auch als Ausgangsstamm für die weitere Selektion dürfte der Stamm *S 1815* am geeignetsten sein.

2. Beim Stamm *S 1207* traten im submersen Verfahren keine neuen Spitzenwerte auf. Die Anzahl der Werte 63 IE war gering, der Anteil der Wertstufen 54, 44 und 32 IE verhältnismäßig gleich. Eine Bestätigung der Eignung des Stammes *S 1207* für das submerse Verfahren liegt nicht vor. Hingegen traten im Oberflächenverfahren neue Spitzen von 75 und 84 IE auf, auch eine hohe Anzahl von Kulturen mit dem Wert 63 IE.

Noch extremer in der gleichen Richtung lagen die Verhältnisse bei dem Stamm *S 1208*. Im submersen Verfahren wurde der Wert 63 IE überhaupt nicht erreicht. Der Anteil der übrigen Wertstufen war noch ungünstiger als beim Stamm *S 1207*. Im Gegensatz dazu erreichte der Stamm *S 1208* im Oberflächenverfahren in hoher Anzahl den Wert 63 IE und erzielte neue Spitzenwerte von 75 IE und 84 IE in höherem Maße als *S 1207*.

Der Stamm *S 1208* war demnach als geeigneter Oberflächenstamm und Ausgangsstamm für weitere Selektion im Oberflächenverfahren anzusehen.

Aus der Möglichkeit einer Anreicherung hoher antibiotischer Werte, der Auffindung neuer Spitzenwerte, aber auch der Aufspaltung der Wertigkeit im Züchtungsverlauf entsteht die Aufgabe einer fortlaufenden Selektion auf der Basis der Spitzenwerte der folgenden Generationen. Gleichzeitig erweist sich die Notwendigkeit einer parallelen Selektion im submersen und im Oberflächen-

verfahren infolge der verschiedenen Eignung des biologischen Materials für die beiden Kulturverfahren.

*G. Kritische Beurteilung des Verdünnungsreihenverfahrens.*

Das Verdünnungsreihenverfahren gestattet eine direkte bzw. absolute Wertbestimmung des Penicillin-Bildungswertes unter laufendem Standardvergleich insbesondere von Spitzenwerten der antibiotischen Aktivität. Die Notwendigkeit des vorherigen Anwachsens der Einsporen-Mikrokultur auf Agarschalen entfällt, da dieselbe sowohl im Oberflächen- wie im submersen Verfahren direkt in die Testkölbchen appliziert wird. Hierdurch ergibt sich zunächst eine erhebliche Zeitersparnis im Selektionsverfahren, wovon Tab. 16 ein Bild vermittelt.

Tabelle 16. Zeitkalkulation für eine Generation des antibiotischen Selektionsverfahrens bei *Penicillium notatum*.

Diffusionsplattenverfahren (Punktimpfung bzw. Einsporenimpfung).  
Indirektes Verfahren mit Vorselektion.

Mikrokultur-Stadium		
Impfung bzw. Isolierung . . . . .	1 Tag	
Anwachszeit im Mikroring . . . . .	11 Tage	Vorselektion im
Testzeit in der Diffusionsplatte . . . . .	9 Tage	Diffusionsplatten-
Anwachszeit auf der 60 mm-Agarplatte .	4 Tage	test
Prüfkultur-Stadium (Kulturkölbchen)		
Abimpfen auf Kölbchen . . . . .	1 Tag	
Anwachsen (Oberflächenkultur) . . . . .	15 Tage	Prüfung im Ver-
„ (submerse Kultur). . . . .	(8) Tage	dünnungsreihentest
Testen in der Verdünnungsreihe . . . . .	2 Tage	
Gesamtzeit . . . . .	43 (35) Tage	

Verdünnungsreihen-Verfahren (Animpfung mit Einsporenmikrokulturen).  
Direktes Verfahren ohne Vorselektion.

Mikrokultur-Stadium

Isolierung . . . . . 1 Tag  
Anwachszeit im Mikroring. . . . . 5 Tage

Prüfkultur-Stadium

Aussetzen auf Kölbchen . . . . . 1 Tag  
Anwachsen (Oberflächenkultur) . . 15 Tage  
„ (submerse Kultur) . (8) Tage  
Testen in der Verdünnungsreihe . 2 Tage

Gesamtzeit . . . . . 24 (17) Tage.

Danach werden bei letztgenanntem Verfahren 20 Tage Zeit in einer Generation gespart. Nicht nur Zeit-, sondern auch Materialersparnis sind bei letzterem Verfahren erheblich, da sowohl der Agar und die Diffusionsplatten sowie die Arbeit für das Ansetzen der Platten entfallen.

Ein gleichfalls recht wesentlicher Faktor, der für die Anwendung des direkten Testverfahrens spricht, ist die Ausschaltung der bakteriellen Unsterilitäts- und Infektionsgefahr mit fremdem Pilzsporen-Material auf der Test- bzw. Anwachsplatte. Die Gefahr der Unsterilität der Mikrokölbchen durch die junge eingebrachte Mikrokultur ist wesentlich geringer als bei der Abimpfung mit Öse von den längere Zeit der Infektionsgefahr ausgesetzten Test- und Anwachsplatten.

### III. Einführung des selektierten Impfmateri als in den Produktions-Prozeß.

Die Übertragung des selektierten Materials auf die Kulturgefäße der Produktion war der Gegenstand verschiedener Versuchsreihen. Die direkte Beimpfung aus 25 ml-Kultürkölbchen durch Übergießen der Sporen-Abschwemmung brachte bei Czapek-Dox-Kölbchen als Ergebnis eine Abwertung in dem Produktions-Impfkolben bzw. gleichartigen Tochterkölbchen (Tab. 17).

Tabelle 17. Abnahme der Aktivität eines Oberflächenstammes bei Weiterimpfung von Sporenabschwemmungen von (15 Tage alten) Kulturdecken, die auf flüssigem Czapek-Dox-Nährboden in 50 ml-Kultürkölbchen gezüchtet wurden.

<i>Stamm A 590. Aktivität in IE . . . . .</i>	87	71	63	54	44	32
1. Generation (Anzahl der Kölbchen) . . . . .	—	13	9	—	—	—
2. Generation (Anzahl der Kölbchen) . . . . .	—	8	27	21	4	—
<i>Stamm A 637. Aktivität in IE . . . . .</i>	87	71	63	54	44	32
1. Generation (Anzahl der Kölbchen) . . . . .	—	12	36	28	8	—
2. Generation (Anzahl der Kölbchen) . . . . .	—	1	—	11	22	9

Auch bei Überimpfung von Kultürkölbchen mit Coghill-Lösung scheinen die Aktivitätswerte nicht auf der zu erwartenden Höhe zu verbleiben, während bei der Beimpfung der Impf-P-Kolben von Schrägröhrchen eine relativ große Aktivitätsbeständigkeit feststellbar war.

Die physiologische Eignung des Agar-Nährbodens wird verständlich, wenn man bedenkt, daß die *Penicillien* natürlicherweise auf festem oder halbfestem Substrat (Käse, Brot usw.) gedeihen und Flüssigkeiten für sie ein anormales Substrat darstellen. Die Weitergabe des selektierten Impfmateri als von festen Nährböden dürfte sich daher als die geeignetste empfehlen.

Ein weiterer Vorteil der Schrägröhrchen, insbesondere bei Verwendung von Bierwürze-Agar als Impfmateri als-Träger ist ihre leichtere Kontrollmöglichkeit auf Fremdsporen-Infektion. Diese Kontrolle ist bei den mit Kulturflüssigkeit beschickten Kultürkölbchen



infolge starker Guttation erschwert. Dieser Umstand sowie die Wahrscheinlichkeit einer vollkommeneren Erhaltung des Penicillin-Bildungswertes auf festem Nährboden, läßt auch für die Impfkolben, für die im allgemeinen flüssige Czapek-Dox-Nährböden verwendet werden, die Agar-Beschickung wünschenswert erscheinen, doch hat sich die Abschwemmung von großen P-Kolben infolge der erheblich hohen, steril überzugießenden Flüssigkeitsmenge (0,5—1 l) nicht als praktisch erwiesen.

Um die Impfkolben als Zwischenträger des selektierten Materials vor Fremd- und minderwertigen Eigenluft-Sporen zu schützen, deren Wirkung sich in den Kulturkolben vervielfacht, entwickelten wir einen sporensicheren und doch luftdurchlässigen Kolben-Verschluß. Er besteht aus einem Wattestopfen und einer Glaskappe. Letztere enthält eine perforierte Pappscheibe als Abschluß. Durch die Öffnung der Pappscheibe und den Wattestopfen ist ein 16 mm-Glasrohr gezogen, das nach außen mit einer Kapsenbergkappe abgeschlossen wird. Die Glasdurchführung ermöglicht eine einfache und einwandfreie Beimpfung bzw. Probeentnahme. Die Vorteile der Gasdurchlässigkeit und der absoluten Sterilität des Wattestopfens werden mit dem stabilen Abschluß durch die Glaskappe und der sterilitätstechnisch einwandfrei zu handhabenden Kapsenberg-Kappe vereinigt.

### Zusammenfassung.

Es werden Verfahren entwickelt:

a) die antibiotische Aktivität von *Penicillium*-Stämmen in Vorselektion auf breiter Basis auszutesten und anzureichern mit Hilfe von Einsporen- bzw. Punktimpfungs-Mikrokulturen im Diffusionsplattentest;

b) aus dem Material eines ausgewählten Stammes durch Einsporen-Isolierung erbreine Linien mit hoher und erbkonstanter antibiotischer Aktivität herauszuzüchten;

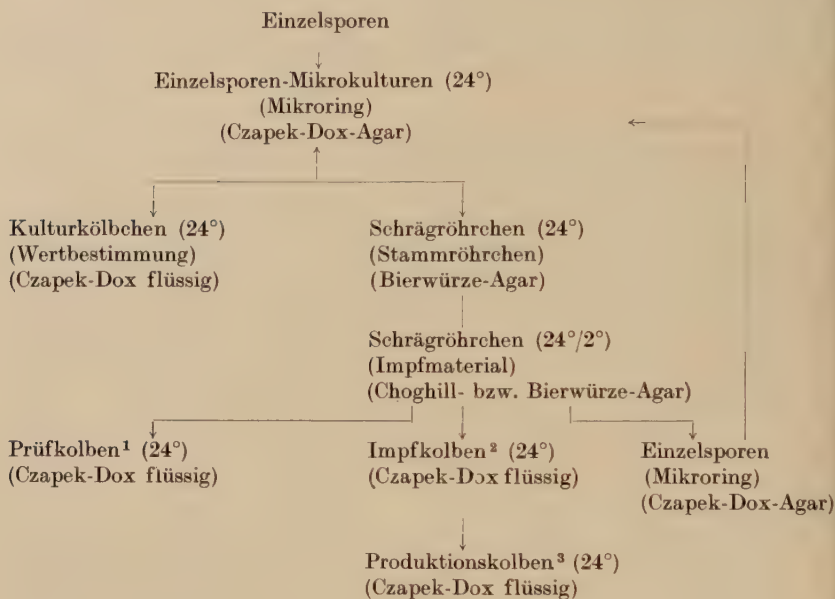
c) das hochgezüchtete Material eines antibiotisch wirksamen Stammes durch laufende Selektionsarbeit bei konstanter antibiotischer Wirksamkeit zu erhalten;

d) durch Ertestung von Spitzenwerten antibiotischer Aktivität im Verdünnungsreihen-Verfahren an Einsporen-Mikrokulturen positive antibiotische Variationen festzustellen und nach Prüfung auf ihre antibiotische Erbkonstanz selektiv weiter zu züchten und damit durch dieselben eine Erhöhung der antibiotischen Produktionsfähigkeit des verwendeten Stammes zu erreichen; unter Umständen unter Überschreitung der Grenzen seiner ursprünglichen antibiotischen Qualität.

Als Begleitprobleme werden die Fragen der Sporenkeimung und der Erhaltung der Aktivität bei der Weiterimpfung antibiotisch hochwertiger Materials sowie die Grenzen des Testbereichs antibiotischer Wertbestimmungsmethoden untersucht.

Das Arbeitsverfahren ist in dem nachfolgenden Schema dargestellt.

*Arbeitsgang der laufenden antibiotischen Einsporen-Selektion mit Verdünnungsreihen-Wertbestimmung.*



<sup>1</sup> Für Oberflächenverfahren; für submerses Verfahren Prüftank.

<sup>2</sup> Für Oberflächenverfahren; für submerses Verfahren Impftank (24°), (Vorkeimung).

<sup>3</sup> Für Oberflächenverfahren; für submerses Verfahren Produktionstank.

### Literatur.

- ABRAHAM, E. P., E. CHAIN and others: Weitere Beobachtungen über Penicillin. *Lancet* **2**, 177 (1941) (Referat); *Brit. Med. Bulletin* **2** (1944) (Referat). — BAMANN, E., u. K. MYRBÄCK: Die Methoden der Fermentforschung. Leipzig 1941. — BERNHAUER, K.: Gärungsschemisches Praktikum. Berlin 1939. — BUCKLAND, F.: Penicillin. *Dtsch. med. Wschr.* **71**, H. 13 (1946). — CHRISTOPHERSEN, J.: Eine neue Methode zur Isolierung von Mikro-Organismen mit Hilfe des Mikro-Manipulators. *Kiel. Zbl. f. Bakteriologie, I. Orig.* **145**, 366 (1940). — COGHILL, R. D.: Penicillin-Herstellung im Oberflächen-Verfahren. Northern Regional Research Laboratory Peoris, Illinois 1943. — ELISEI, F. G.: Osservazioni sul nucleo dei *Penicillium* (Referat). *Berichte Wiss. Biol.* **54**, 6 (1940). — GÄUMANN, E.: Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena 1926. — JANKE, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden und Leipzig 1946. — HEATLEY, N. C.: A method for the assay of Penicillin. *Biochem. J.* 1944 (Referat). — KILLIAN, H.: Die Penicilline. Freiburg i. Br.-Aulendorf/Wttbg. 1948. — KLEBS, G.: Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena 1928. — KNÖLL, H.: Versuche zur Gewinnung und Wert-

bestimmung antibiotischer Pilzwirkstoffe. Deutsches Gesundheitswesen **1** (1946); Zur Wertbestimmung des Penicillins, Pharmazie **2**, 9, 392 (1947). — KÜHNE, P.: Pharmazie **1** (1946). — LAFAR, F.: Handbuch der technischen Mykologie. Jena 1905—14. — LEMBKE, A.: Ergebnisse der theoretischen und angewandten Mikrobiologie. Neudamm 1943. — PONTECORVO, G., u. A. R. GEMMEL: Genetischer Nachweis der Heterokaryosis bei *Penicillium notatum* (Referat). Nature, London 1944. — SCHMIDT, H. W., u. J. A. MOYER: Penicillin I. Untersuchungsmethoden. Journ. of Bacteriology **47** (1944) (Referat). — SCHÜRHOFF, V.: Über *Penicillium crustaceum* Fries. Beih. Bot. Cbl. **22**, Abt. I, 294 (1907). — WAKAYAMA, K.: Contributions to the Cytology of Fungi III. Chromosome number in *Aspergillus*. Cytologia **2**, 231 (1931).



## **Acetobacter Lafarianum nov. nom.**

Von

ALEXANDER JANKE (Wien).

(Eingegangen am 2. Mai 1945.)

Vor vielen Jahren hat Verfasser [1] aus Lagerbieren des Wiener Handels eine große Zahl von Essigsäure-Bakterien isoliert, unter denen sich auch Vertreter einer neuen Gruppe befanden, die als Gruppe des *Bact. Hansenianum* bezeichnet wurde.

Wie sich jedoch erst jetzt herausstellte, findet sich ein Bakterium mit gleicher Speziesbezeichnung (*Acetobacter Hansenianum*) bereits bei CHESTER [2] angegeben. Nun wird wohl in BERGEYS „Manual of Determinative Bacteriology“ [3] diese Art als identisch mit *Acetobacter aceti* (Kützing) Beijerinck bezeichnet, das als typische Art für das Genus *Acetobacter* Beijerinck angegeben wird. Wie an anderem Orte noch des näheren ausgeführt werden soll, ist jedoch bei dieser typischen Spezies eine teilweise Verwechslung des syntrophen *Bact. aceti* Hansen mit dem haplotrophen *Acetobacter aceti* Beijerinck unterlaufen, so daß auch die Identität des letzteren mit dem CHESTERschen Organismus in Frage gestellt erscheint. Verfasser sieht sich daher veranlaßt, das von ihm aufgefundene Bakterium in *Acetobacter Lafarianum* nov. nom.<sup>1</sup> umzubenennen. Dessen Eigenschaften sowie jene einer Varietät sollen nachstehend zusammengefaßt werden.

### *Acetobacter Lafarianum* Janke nov. nom.

#### A. Morphologie.

1. *Morphologie des Einzelwesens*: Kurzstäbchen ( $0,7-1,2\ \mu$ ;  $0,7-0,8\ \mu$ ) vorwiegend einzeln oder zu zweien, mitunter auch in kürzeren Ketten, mit Eigenbewegung. Kürzere Fäden (bis zu  $6\ \mu$ ) finden sich nur selten, andere atypische Formen überhaupt nicht. Die Zellenden sind abgerundet, bei guter Kohlenhydratnahrung (z. B. auf Doppelbier) mehr eckig, auf Hefewasser hingegen etwas zugespitzt. — 2. *Morphologie der Zellgemeinschaften*: a) Auf flüssigen Nährsubstraten, wie Lager-

<sup>1</sup> Nach FRANZ LAFAR, Dr. phil. et Dr. techn., Professor an der Technischen Hochschule in Wien (1. 4. 1897 bis 30. 4. 1917; † 24. 12. 1938) dem hervorragenden Fachmann auf dem Gebiete der Essig-Bakteriologie.

bier (12°ig mit 3 Vol% Äthanol), Doppelbier (mit 2,2 Vol% Äthanol), Hefewasser (10°ig mit 3 Vol% Äthanol) oder mineralische Nährlösung J (0,04 g  $K_2HPO_4$ , 0,1 g  $(NH_4)_2HPO_4$ , 0,04 g  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,5 ml Glycerin und 0,1 g Bernsteinsäure in destilliertem Wasser gelöst und mit diesem auf 100 ml aufgefüllt) bei 30°C nach 6 Tagen: graulichweiß-durchscheinende bis gelblich-weiße, fadenziehende bis zähschleimige Haut auf der getrübbten Flüssigkeit; die Haut färbt sich mit Jodlösung (in Äthanol oder KJ) gelb. b) Auf festen Nährsubstraten:  $\alpha$ ) Strichzuchten auf Lagerbier-Gelatine (10—12% Gelatine mit 3 Vol% Äthanol), Lagerbier-Agar (2% Agar-Agar, 3 Vol% Äthanol) oder Würzeagar (2% Agar-Agar, 3 Vol% Äthanol): graulichweiß-durchscheinende, hohe, fadenziehende, weichschleimige, aber nicht abrinne Beläge. Die Wachstumsbilder sind im allgemeinen weniger charakteristisch als auf flüssigen Nährböden. —  $\beta$ ) Riesenkolonien auf Würzegelatine (Anlage in Petrischale mittels steriler Zeichenfeder): raschwüchsig (3—4 mm), erhaben, feuchtglänzend, weichschleimig, glatt, graulichweiß-durchscheinend; bei mikroskopischer Betrachtung im durchfallenden Licht: gelbgrau, strahlig angeordnete dunklere Bänder.

## B. Physiologie.

1. *Temperaturoptimum für das Wachstum* relativ weit (20—30°C). — 2. *Säuerung von Äthanol*: Säuerungsmaximum relativ niedrig; bei Zimmertemperatur 3,7 g Essigsäure je 100 ml. — 3. *Säuerung von Glykose*, untersucht auf Glykose-Kreide-Agar nach WATERMAN und in Hefewasser (+ 10% Glykose) ziemlich stark; zur Neutralisation von 100 ml Hefewasser werden bis zu 19 ml n-Natronlauge verbraucht. — 4. *Säuerung von Disacchariden*, untersucht in Hefewasser mit Zusatz von 5% des Zuckers (bei Saccharose jedoch 10%): Saccharose, Maltose und Lactose werden nicht gesäuert. — 5. *Säuerung von Malzwürze* schwach, da Maltose nicht, wohl aber Glykose gesäuert wird. — 6. *Wachstum auf Beijerincks Nährlösung* [0,05 g  $(NH_4)_2HPO_4$ , 0,01 g KCl in Leitungswasser gelöst und mit diesem auf 100 ml aufgefüllt; nach der Sterilisation Zusatz von 3 Vol% Äthanol und von soviel Essigsäure, als zur Lösung des entstandenen Niederschlags gerade nötig ist]: auf der klar bleibenden Flüssigkeit bildet sich eine weißlich-durchscheinende fadenziehende Haut. Da demnach gutes Wachstum auftritt, ist *Acetobacter Lafarianum* zu den haplotrophen Essigsäurebakterien zu rechnen. — 7. *Aufzehrung der Essigsäure* tritt entsprechend dem Wachstum mit Essigsäure als einziger C-Quelle ein (Überoxydation). — 8. *Widerstandskraft gegenüber Essigsäure* ziemlich bedeutend; so tritt in Lagerbier noch bei Zusatz von 6 g Essigsäure zu 100 ml Lagerbier (+ 3 Vol% Äthanol) deutliches Wachstum ein.

*Acetobacter Lafarianum* var. *vindobonense*<sup>1</sup>.

Diese Varietät unterscheidet sich von der vorstehend beschriebenen Art vor allem durch das Verhalten zu Jodlösung; beim Behandeln mit letzterer tritt nämlich eine *braunviolette* Färbung auf, die sich bei mikroskopischer Prüfung als eine Mischfärbung aus gelb und rotviolett tingierten Schleimmassen ergibt. Auch unter so einfachen Ernährungsverhältnissen, wie sie die BEIJERINCKsche Nährlösung bietet, tritt diese Färbung ein. Weitere Unterschiede bestehen in der starken Säuerung von Saccharose sowie im mikroskopischen Bild der Riesenkolonien auf Würzegelatine; dieses zeigt eine gelbliche Grundmasse von rosettenartiger Form, gegen den Rand zu einen dunkleren gelbgrauen Ring, daran anschließend eine gelbliche Randzone, die in farblos übergeht; späterhin nimmt die ganze Kolonie eine schwach rosa Färbung an.

**Literatur.**

[1] JANKE, A.: Zbl. Bakt. II. Abt. **45**, 1—50 (1916). — [2] CHESTER: Manual of Determinativ Bacteriology, 1901, 126. — [3] BERGEYS Manual of Determinativ Bacteriology, 6. Aufl., Baltimore 1948.

---

<sup>1</sup> Der Name der Varietät nimmt Bezug auf das Vorkommen derselben in Wiener Bieren.



(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

## Experimentelle Untersuchungen zur Ausbildung von Faden- und Kettenformen bei *Bacterium prodigiosum*\*.

Von

EDITH HEINZEL

(Mit 5 Textabbildungen.)

(Eingegangen am 19. Mai 1949.)

In der Literatur finden sich zahlreiche Angaben über Veränderungen in der Form der Bakterienzelle, sowohl hinsichtlich ihrer Größe wie auch des Auftretens von Einzelzellen oder kurzen und langen Ketten (MINOUX, ROLIN, STAPP und RUSCHMANN, PÉJU und RAJAT). Aber es fehlt bisher noch eine systematische, an einer Art durchgeführte

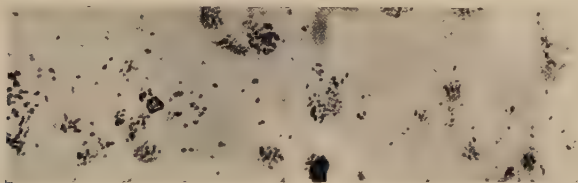


Abb. 1. *Bacterium prodigiosum*. Normalkultur. Vergr. 600 mal.

Untersuchung aller derjenigen Faktoren, die zur Erklärung für das Zustandekommen dieser Erscheinungen herangezogen werden könnten. Im folgenden soll nun über einige Versuchsreihen berichtet werden, die sich mit Untersuchungen über die Faden- und Kettenbildung bei *Bacterium prodigiosum* durch Zusätze verschiedener Neutralsalze befassen und welche im Hinblick auf das Problem der Salzeinwirkung auf die Bakterieneinzelzelle, insbesondere auch der Beeinflussung des Wachstums- und Teilungsmechanismus, von einigem Interesse sein dürften. Vergleichsweise wurden noch einige weitere Bakterien und *Proactinomyceten* hinzugenommen.

Unter normalen Kulturverhältnissen (Dextrose-Probacit-Agar) wächst *Bact. prodigiosum* mit sehr beweglichen Einzelzellen von  $0,5\ \mu$  Breite und  $0,7\ \mu$  Länge (Abb. 1). Als Ketten sind im folgenden septierte, als Fäden unseptierte Formen bezeichnet.

---

\* Auszug aus der gleichnamigen Dissertation, Göttingen, mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, 1948.

### Versuchsbedingungen.

Im Verlauf der Untersuchungen erwies sich Dextrose-Probacit-Agar (5 g Dextrose, 6 g Pepton, 4 g Probacit der Maggigesellschaft, 16 g Agar, 1000 cm<sup>3</sup> Wasser) als Kultursubstrat für *Bact. prodigiosum* als besonders günstig. Die verschiedenen Salze wurden in gelöster Form zugesetzt. Hierzu wurden 3-normale Salzlösungen hergestellt und dann die zu untersuchende Konzentration auf 5 cm<sup>3</sup> Gesamtflüssigkeit berechnet, in Reagensgläser einpipettiert und auf 2 cm<sup>3</sup> mit dest. Wasser aufgefüllt. Zu diesen 2 cm<sup>3</sup> Salzlösung wurden 3 cm<sup>3</sup> Dextrose-Agar  $\frac{3}{5}$  zugegeben; Dextrose-Agar  $\frac{3}{5}$  enthält bei gleicher Nährstoffmenge nur  $\frac{3}{5}$  der für normalen Agar angegebenen Wassermenge. Man arbeitet auf diese Weise mit einem Medium, dessen Salzkonzentration beliebig eingestellt werden kann und dessen Nährstoffe und Agarkonsistenz unverändert bleiben. Die verwendete Nährlösung war ungepuffert bis auf die besonderen später zu erwähnenden Versuche.

Die einzelnen in den Tabellen erscheinenden Bewertungen wurden folgendermaßen gewonnen: Wachstum und Farbstoffbildung wurden makroskopisch bestimmt. Die Normalkultur ist ziegelrot gefärbt. Die in den Tabellen angegebenen Werte für die Schleimbildung beziehen sich auf Vergleiche mit Kontrollkulturen während des experimentellen Arbeitens. Es läßt sich nämlich beim Überimpfen der Bakterien leicht feststellen, ob es sich um eine unverschleimte (–), verschleimte (+) oder stark verschleimte (+++) Kultur handelt. Die Beweglichkeit wurde mikroskopisch in Wasseraufschwemmungen jeweils im Vergleich mit salzfreien Kontrollkulturen bestimmt.

### Versuchsergebnisse mit *Bact. prodigiosum*.

#### Alkalisalze.

##### a) Chloride.

Die Ergebnisse der Versuche mit Alkalisalzen sind in den Tab. 1–3 aufgeführt. Abb. 1 zeigt das Bild der normalen Kultur. Im einzelnen ergibt sich folgendes (Tab. 1):

Lithiumchlorid bewirkt keine eigentliche Faden- oder Kettenform. Bis zu einer Konzentration von 0,19 mol/Liter finden sich bewegliche Kokkenformen (0,5  $\mu$ ). Kulturen mit Zusätzen von 0,20–0,48 mol/Liter zeigen eine starke Tendenz zur Bildung von Doppelkokken. Bei noch höheren Konzentrationen beobachtet man 4gliedrige Kokkenkurzketten, eine nur vorübergehende Erscheinung, welche nach 24 Std bereits wieder in Einzelkokken zerfallen sind.

Bei Natrium- und Kaliumchlorid-Zusätzen wird bei höheren Salzgaben die Inkubationszeit merklich verlängert, welche bei Gaben von 1,35 mol/Liter beispielsweise 7 Tage beträgt. Bis zu einer Salzzugabe von 0,30–0,50 mol/Liter sind die Zellen identisch mit den salzfreien Kontrollkulturen. Im Bereich von 0,70–0,95 mol/Liter werden Kurzketten gebildet, die sehr bald im weiteren Verlauf der Entwicklung zerfallen, von 1,00 mol/Liter an aufwärts schließlich lange, unseptierte Fäden. Diese sind sehr schleimig und bilden keinen Farbstoff mehr aus. Die Kurzketten sind gerade, gestreckt oder abgewinkelt, die Fäden dagegen sehr gewunden.

Die Rubidium-Kulturen weisen Ketten auf mit außerordentlich scharfer Gliederung, die Fäden sind trotz ihrer beträchtlichen Länge (50  $\mu$ ) ganz gestreckt.

In den Cäsium-Kulturen erinnern die gestreckten, farblosen Fäden sehr an Kulturen mit Rubidiumchloridzusatz, sind aber noch länger (75  $\mu$ ) und werden schon bei sehr geringen Konzentrationen ausgebildet (vgl. Abb. 2 für 0,04 mol/Liter Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Eine starke Herabsetzung der gesamten Vitalitätserscheinungen kennzeichnet den toxischen Charakter des Salzes.

Bei Ammoniumchlorid-Zusatz tritt eine für Ammoniumsalze typische Kettenform mit sehr scharfer Septierung in den Vordergrund. Die Farbstoffbildung wird selbst bei den noch erträglichen Salzgrenzkonzentrationen nicht völlig eingestellt, die Kulturen bleiben durchsichtig matt-rosa gefärbt.

Aus Tab. 1 läßt sich ersehen, daß allen Alkalichloriden eine spezifische Wirkung zukommt. Jedoch zeigen die Chloridverbindungen der betreffenden Elemente einige gemeinsame Eigenschaften. Alle Alkalichloride müssen in einer Mindestkonzentration von

Tabelle 1. Wirkung von Alkalichloriden auf *Bacterium prodigiosum*.

Salz	LiCl		NaCl		KCl	
mol/Liter . .	0,50	0,80	1,00	1,40	0,80	1,40
Wachstum . .	+++	++	++	+-	++	+-
Farbe . . . .	rot	rosa	weiß	weiß	++	weiß
Schleim . . . .	+	++	++	++	rot	+
Bakterienform	Diplokokken	Kokk.-Kett.	Kett. u. Fäd.	Fäden	-	Fäden
und -länge . .	1 $\mu$	2 $\mu$	10-20 $\mu$	25 $\mu$	Ketten 5 $\mu$	30-50 $\mu$

Salz	RbCl		CsCl		NH <sub>4</sub> Cl	
mol/Liter . .	0,80	1,00	0,07	0,10	0,80	1,10
Wachstum . .	+-	+-	+-	+-	++	+-
Farbe . . . .	weiß	weiß	weiß	weiß	rosa	rosa
Schleim . . . .	+	++	++	++	+	+
Bakterienform	Fäden	Fäden	Fäden	Fäden	Ketten	Fäden
und -länge . .	10 $\mu$	50 $\mu$	40 $\mu$	75-100 $\mu$	10 $\mu$	50 $\mu$

Für Wachstum und Schleimbildung (zugleich für die folgenden Tabellen): +++ = stark; ++ = mäßig; + = gut; +- = mäßig; - = sehr gering.



0,80 mol/Liter zugesetzt werden, um Kettenbildung hervorzurufen, nur bei CsCl liegt sie sehr viel tiefer, nämlich bei 0,03 mol/Liter.

Die Salzgruppe zeigt eine ziemlich einheitliche Ketten- und Fadenzlänge für die Elemente Na, K, Rb und für  $\text{NH}_4$ , nämlich 25—40  $\mu$ , während ein LiCl-Zusatz extrem niedrige Werte (5  $\mu$ ) und CsCl-Zusatz extrem hohe Werte (75—100  $\mu$ ) gibt. Hierzu ist zu bemerken, daß das Element Lithium sich als Spitzenelement der ersten Gruppe im Periodischen System in seinen Eigenschaften dem Magnesium der zweiten Gruppe nähert, welches auch bei hoher Konzentration ausschließlich Diplokokken ausbildet.

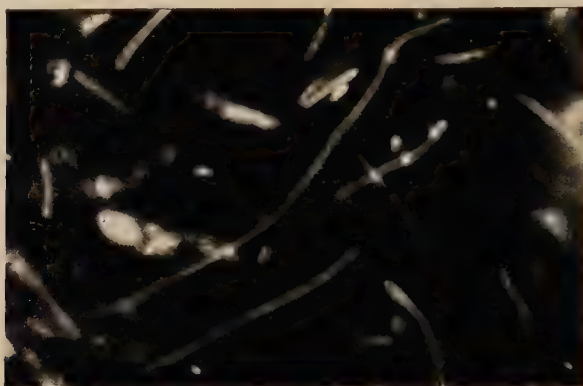


Abb. 2. *Bacterium prodigiosum*. 0,04 mol/Liter  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Zusatz (Dunkelfeldbel.), Vergr. 1000mal.

#### b) Sulfate.

Hohe Molaritäten von  $\text{SO}_4$ -Ionen (Tab. 2) werden besser vertragen als von Cl-Ionen. Lithium-, Natrium-, Kalium- und Rubidiumsulfat sind ohne Einfluß auf die Kettenbildung bei *Bact. prodigiosum*. Nur bei

Tabelle 2. Wirkung von Caesium- und Ammoniumsulfat auf *Bact. prodigiosum*.

mol/Liter	Wachstum	Farbe	Schleim	1. Tag	2. Tag	3. Tag
$\text{Cs}_2\text{SO}_4$						
0,009	++	rosa	—	5 $\mu$	1 $\mu$	1 $\mu$
0,010	++	rosa	+—	25 $\mu$	8 $\mu$	1 $\mu$
0,020	++	weiß	+	45 $\mu$	20 $\mu$	8 $\mu$
0,030	+—	weiß	++	75 $\mu$	75 $\mu$	75 $\mu$
0,040	+—	weiß	+++	50—200 $\mu$	50—200 $\mu$	50—200 $\mu$
0,045	+—	weiß	+++	50—200 $\mu$	50—200 $\mu$	50—200 $\mu$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$						
0,40	++	rosa	—	3—5 $\mu$	1 $\mu$	1 $\mu$
0,50	++	rosa	+—	3—5 $\mu$	5—10 $\mu$	10 $\mu$
0,60	+—	rosa	+	—	30 $\mu$	30 $\mu$
0,65	+—	rosa	+	—	—	30 $\mu$

Zusätzen von Cäsiumsulfat treten ungewöhnlich lange Zellfäden auf (100—200  $\mu$  siehe Abb. 2 für 0,04 mol/Liter  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ ). Die Fäden bleiben bis zum Absterben der Kultur erhalten. Bei Gaben von Ammoniumsulfat ist das mikroskopische Bild nahezu identisch mit dem der Ammoniumchloridkulturen. Die Ketten sind scharf septiert und die Einzelglieder fast zylindrisch gestaltet.

## c) Nitrate.

Ein Vergleich der Nitratwerte in Tab. 3 mit den entsprechenden Chloridwerten (Tab. 1) veranschaulicht, daß Kettenbildung durch Nitratzusatz mit genau der Hälfte der für Chloride erforderlichen Salzmenge hervorgerufen werden kann. Daneben bleibt die spezifische Wirkung der Kationen erhalten.

Tabelle 3. Wirkung von Alkalinitraten auf *Bact. prodigiosum*.

	$\text{LiNO}_3$	$\text{NaNO}_3$	$\text{KNO}_3$	$\text{RbNO}_3$	$\text{CsNO}_3$	$\text{NH}_4\text{NO}_3$
Mol/Liter . . .	0,40	0,35—0,4	0,35—0,4	0,40	0,03—0,08	0,35—0,40
Wachstum . .	+	++	++	++	+-	+++
Farbe. . . .	rot	rot	rot	weiß	weiß	rot-rosa
Schleim. . . .	—	+	+	+	++	+-
Bakterienform						
u. -länge . .	Diplo- kokken Kokken- ketten 2 $\mu$	Ketten Fäden 25—50 $\mu$	Ketten Fäden 25—40 $\mu$	Fäden 40 $\mu$	Fäden 100 $\mu$	Ketten 25 $\mu$

## Erdalkalisalze.

Aus Tab. 4 ist leicht abzuleiten, daß der Wirkungsmechanismus der Erdalkalisalze ein ganz anderer sein muß als der der Alkalichloride.

Tabelle 4. Wirkung von Erdalkalichloriden auf *Bact. prodigiosum*.

mol/Liter	Wachstum	Farbe	1. Tag	3. Tag	5. Tag
$\text{MgCl}_2$					
0,1	+++	rot	Kokken	Kokken	Kokken
0,2	+++	rot	Kokken	Kokken	Kokken
$\text{CaCl}_2$					
0,2	++	rosa	Kokken	Kokken	Kokken
0,3	+-	rosa	Kurzketten	Kokken	Kokken
0,4	+-	rosa	Kurzketten	Kokken	Kokken
$\text{SrCl}_2$					
0,1	++	rot	Kokken	Kokken	Kokken
0,2	+-	rosa	Kokkenketten	Kokken	Kokken
$\text{BaCl}_2$					
0,1	+	rosa	Kokkenketten	Kokken	Kokken
0,15	—				

Längere Faden- oder Kettengebilde wurden niemals beobachtet. Die Kurzketten, deren Einzelglieder zur Kokkenform neigen, sind sehr unbeständig und erinnern an Kulturen mit Lithiumzusätzen. Die Höhe der zur Kettenbildung erforderlichen Salzkonzentration nimmt mit steigendem Atomgewicht in der Reihenfolge des Periodischen Systems ab: Calcium 0,30, Strontium 0,20, Barium 0,10 mol/Liter. Magnesiumzusätze führen nicht zu Fadenformen.

#### *Wirkung von Säuren und Basen.*

Der Zusatz von anorganischen Säuren und Basen bewirkt keine Faden- und Kettenbildung bei *Bact. prodigiosum*. Es wurden Versuche ausgeführt mit chemisch reiner Salzsäure, Salpetersäure und Schwefelsäure, mit Natriumhydroxyd, Kaliumhydroxyd und Bariumhydroxyd. Dagegen bewirken geringste Zusätze von Borsäure scharf gegliederte Kettenformen (vgl. hierzu: Die Begünstigung des Pollenschlauchwachstums durch Borsäure nach TH. SCHMUCKER).

Ebenso verliefen alle Untersuchungen mit zahlreichen organischen Säuren und ihren Salzen mit den verschiedensten chemischen Eigenschaften hinsichtlich einer Kettenbildung negativ. Lediglich die Natrium- und Kaliumsalze der Dichlorbenzolsulfonsäure bewirken in geringer Dosierung Kettenbildung, was sich aus der im Vergleich zu den übrigen angewandten organischen Säuren stärkeren Dissoziation erklären läßt.

#### *Salzgemische.*

In weiteren Versuchen wurde geprüft, ob das Kettenbildungsvermögen der einzelnen Salze durch Kombination gleicher Kationen mit verschiedenen Anionen, gleicher Anionen mit verschiedenen Kationen und verschiedener Anionen mit verschiedenen Kationen gesteigert oder aufgehoben werden kann. Diese Salzkombinationen können entweder additiv wirken, d. h. die kettenfördernde bzw. -hemmende Wirkung der beiden Salzpartner addiert sich, oder sie können antagonistische Wirkung aufweisen. Der Ionenantagonismus bei der Kettenbildung zeigt weitgehende Übereinstimmung mit den Erscheinungsbildern, die von antagonistisch beeinflussten Quellungs- und Entquellungsversuchen her bekannt sind.

Bei Kombination zweier Alkalichloride heben sich die Wirkungen der beiden Einzelsalzpartner auf die Kettenbildung größtenteils auf. Kombiniert man dagegen NaCl oder KCl mit LiCl, so erhält man bei hohen NaCl- und tiefen LiCl-Konzentrationen Fäden von größerer Länge, als sie bei der gleichen Konzentration jedes einzelnen Partners auftreten. Ein Antagonismus zwischen Na oder K und  $\text{NH}_4$  besteht in geringem Grade, wobei erwähnt werden muß, daß K und Na weit weniger toxisch sind als  $\text{NH}_4$ . Die Wirkung des Kations  $\text{NH}_4$  wird deshalb vorherrschen.

Salzgemische von Alkalichloriden mit Alkalisulfaten- oder nitraten, desgleichen von Alkalinitraten oder auch Erdalkalichloriden unter-



einander wirken nicht antagonistisch. Vielmehr haben sie einen begünstigenden Einfluß auf die Kettenlänge (Additivwirkung).

Antagonistisch dagegen wirken wieder Kombinationen von Alkali- und Erdalkalisalzen oder von Erdalkalinitraten untereinander, Beobachtungen, die schon seit langem bei physiologischen Studien gemacht wurden. Ausnahmen bestehen seitens der Ammonium- und Lithiumverbindungen, wobei einmal die Ammoniumeigenschaften dominieren, zum andern bei Zugabe von Lithium zu Erdalkalichloriden die ent-

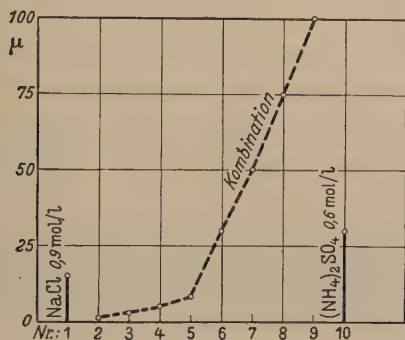


Abb. 3.

Abb. 3. Wirkung einer Mischung von Natriumchlorid und Ammoniumsulfat auf *Bacterium prodigiosum*. Die Ordinate bei 1 stellt die Fadenlänge für 0,90 mol/Liter NaCl-Zusatz dar, die Ordinate bei 10 die Fadenlänge für 0,60 mol/Liter  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Die Punkte 2–9 zeigen die Länge bei verschiedenen Mischungsverhältnissen der beiden Kombinationspartner.

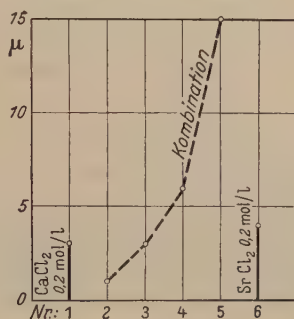


Abb. 4.

Abb. 4. Wirkung einer Mischung von Calcium- und Strontiumchlorid auf *Bacterium prodigiosum*.  
Erklärung siehe unter Abb. 3.

quellenden Kationenwirkungen beider Partner (jeweils Kokkenketten) in bestimmten Mischungsverhältnissen vollständig aufgehoben werden, ja sogar eine gegenteilige Plasmabeeinflussung stattfindet (Stäbchenketten).

Einige wenige Beispiele der Ionenadditivwirkung bei Anwendung von Salzgemischen sollen aus den beigefügten Abb. 3 und 4 ersichtlich werden.

Bei der antagonistischen Wirkung von Salzgemischen handelt es sich darum, daß die kettenbildenden Faktoren beider Salze durch das Zusammenwirken stark gehemmt oder vollständig aufgehoben werden. Einen sehr starken Ionenantagonismus findet man bei der Kombination von NaCl und CsCl, wie Tab. 5 zeigt. Die Fadenbildung bleibt bereits bei einer Cäsiumchloridkonzentration von nur 0,01 mol/Liter aus.

Tabelle 5. Antagonistische Wirkung der Salzkombination  $\text{NaCl}$ - $\text{CsCl}$  auf die Fadenbildung bei *Bact. prodigiosum*.

[illegible]

Die folgende Übersicht zeigt, unter welchen Kombinationen der Salze eine Additiv- oder eine antagonistische Wirkung eintritt:

- a) Additivwirkung  
 Alkalichlorid + Alkalinitrat  
 Alkalichlorid + Alkalisulfat  
 Alkalinitrat + Alkalinitrat
- b) Antagonistische Wirkung  
 Alkalichlorid + Alkalichlorid  
 Alkalichlorid + Erdalkalichlorid  
 Erdalkalichlorid + Erdalkalichlorid  
 Alkalisalze + Lithiumsalze  
 Alkalisalze + Salze organischer Säuren.

*Quantitative und qualitative Veränderung des Normalmediums bei Salzzusatz.*

Um feststellen zu können, ob eine bestimmte Menge Kohlenstoff und Stickstoff eine mögliche Kettenbildung fördert oder herabsetzt, wurde der Prozentgehalt des Normalmediums an Pepton, Dextrose und Probacit variiert. Ohne Zusatz wirksamer Salze verändert sich die morphologische Form nicht, außer bei typischen Nährstoffmangelzellen (Involutionsformen bei kümmerlichem Wachstum), wenn das Mindestmaß an Kohlenstoff 0,10% und Stickstoff 0,005% unterschritten wird.

In Salzmedien dagegen ist ein bestimmtes Kohlenstoff:Stickstoffverhältnis für die Länge der Ketten und Fäden ausschlaggebend. Bei Überschreiten des Maximalwertes für die Kohlenstoffquelle bzw. bei Unterschreiten des Minimalwertes für die Stickstoffquelle wird die Kettenlänge wieder verkürzt. Die Optimalwerte für den Gehalt an Dextrose und Pepton ergeben kombiniert die günstigsten Kettenlängen. Für *Prodigiosum*kulturen erweisen sich am vorteilhaftesten: Dextrose = 2%, Pepton = 0,01%.

Tabelle 6. *Optimalwerte an Dextrose und Pepton für die Kettenlänge bei Bact. prodigiosum.*

Dextrose Gew. %	Pepton Gew. %	Fadenlänge bei Zusatz von 1,0 mol/Liter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2,00	0,01	100 $\mu$
2,00	0,005	75 $\mu$
1,00	0,01	25 $\mu$
0,10	0,40	10 $\mu$
0,01	1,00	2—4 $\mu$

Bei günstiger Kohlenstoff:Stickstoffvariation kann eine Verlängerung der Ketten um das 5—7fache der Kontrollkulturen erzielt werden. Diese Ergebnisse führten zu der Frage, ob bei günstigen Kohlenstoff-Stickstoffwerten zur Kettenbildung nicht geringere Salzkonzentrationen als die üblichen ausreichen dürften. Alle diesbezüglichen Versuche verliefen jedoch negativ. Daraus läßt sich folgern: Dem Nährboden muß

eine Mindestmenge an Salz zugegeben werden, damit eine Kettenbildung überhaupt zustande kommt. Die Kettenlänge kann dagegen durch ein optimales Kohlenstoff/Stickstoffverhältnis um ein Vielfaches vergrößert werden.

Bei der qualitativen Veränderung des Nährsubstrates wurde die Dextrose-Kohlenstoffquelle ersetzt durch Rohrzucker, Ammoniumsulfat, Glycerin, lösliche Stärke, Dextrin, Pektin und Mucin; die Pepton-Stickstoffquelle durch Asparagin, Kaliumnitrat, Ammoniumsulfat und Alanin. Als kettenbildendes Salz wurde ein Gemisch von  $\text{NaNO}_3$  0,40 mol/Liter und  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,20 mol/Liter zugesetzt.

Bei Verwendung von Rohrzucker, Ammoniumtartrat und Kaliumnitrat, Ammoniumsulfat, Alanin sind die Versuchsergebnisse die gleichen wie bei günstigen Gaben von Dextrose und Pepton. Wird Glycerin als Kohlenstoffquelle geboten, so wird die Kettenbildung in ihrer Länge erheblich

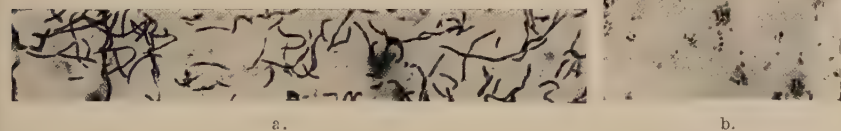


Abb. 5. *Bact. prodigiosum*. Vergr. 1000 mal. a. 2% Dextrose, 0,4 mol/Liter  $\text{NaNO}_3$  + 0,2 mol/Liter  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . b. 2% Stärke, 0,4 mol/Liter  $\text{NaNO}_3$  + 0,2 mol/Liter  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

herabgesetzt (Höchstwerte  $5\mu$  gegen  $25\mu$  bei der Dextrosekontrolle).

Die Polysaccharide Stärke, Dextrin, Pektin und Mucin unterdrücken auch in Salzlösungen die Kettenbildung vollständig, man erhält bei gutem Wachstum der Kulturen Kokkenformen, deren Längendimensionen unter denen der Normalkulturen liegen, wie die Abb. 5a und 5b zeigen.

Zur Erklärung kommen zwei Möglichkeiten in Betracht:

1. Kettenbildung ist bei *Bact. prodigiosum* von spezifischen Kohlenhydraten abhängig (Dextrose, Rohrzucker, Ammoniumtartrat).

2. Die Polysaccharide werden schlechter verwertet als die oben angeführten Kohlenhydrate. Wird Stärke als Kohlenstoffquelle gegeben, so ist nach 6—10 Tagen Kulturdauer die Stärkereaktion noch deutlich positiv; d. h. das für den Organismus verwertbare Verhältnis Kohlenstoff/Stickstoff liegt tiefer als das errechnete; es kann keine Kettenbildung auftreten.

### *Physikalische Änderung der Salznährböden.*

Durch rein physikalische Veränderung des Normalmediums läßt sich die Stäbchenform nicht in die Fadenform überführen. In Salzmedien dagegen ist die Fadenlänge durch einige physikalische Faktoren beeinflussbar.



So wurde bei Variation des  $p_H$ -Wertes festgestellt, daß die Kettenbildung in sauren und alkalischen Medien stark gehemmt bzw. ausgeschaltet wird und das Optimum der Kettenlänge im Neutralgebiet liegt. Als Beispiel möge ein Versuch mit Ammoniumsulfat dienen, der aus Tab. 7 zu entnehmen ist, wobei noch zu bemerken ist, daß in ungepufferten Substraten erheblich größere Fadenlängen zu finden sind.

In den Salzmedien wurde der  $p_H$ -Wert durch Pufferlösungen eingestellt auf  $p_H = 4-6$  (Citronensäure/Salzsäure),  $p_H = 6-7,5$  (Phosphatpuffer),  $p_H = 7,5-9$  (Citronensäure/Natronlauge). Da die Ionen der Pufferlösungen ihrerseits die Kettenbildung wieder antagonistisch beeinflussen können, wurden daneben auch Glykokollmischungen zum Puffern verwandt.

Tabelle 7. Abhängigkeit der Kettenbildung bei *Bact. prodigiosum* vom  $p_H$ -Wert bei Ammoniumsulfatzusatz.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mol/Liter	$p_H = 5,0$	$p_H = 6,8$	$p_H = 8,8$	ungepuffert
0,4	2 $\mu$	2 $\mu$	3 $\mu$	2 $\mu$
0,5	2 $\mu$	12 $\mu$	2 $\mu$	20 $\mu$
0,6	2 $\mu$	12 $\mu$	kein Wachstum	25 $\mu$
0,7	2 $\mu$	25 $\mu$	kein Wachstum	70 $\mu$

Die Variation der Agarkonsistenz ergibt bei Gegenwart von Salzen eine längere, beständigere Kettenform auf 2%igem Agar. Durch die erhöhte Agarquellung wird das zur vollständigen Teilung der Kettenglieder notwendige Wasser zu fest an das Substrat gebunden.

Bei Änderung von Temperatur, Oberflächenspannung und relativer Luftfeuchtigkeit konnten keine Unterschiede bezüglich der Kettenlänge festgestellt werden.

#### Vergleichende Salzversuche mit einigen weiteren Mikroorganismen.

Die vorangehenden Salzversuche mit *Bact. prodigiosum* haben gezeigt, daß dieser Organismus auf die verschiedenen Salze nicht gleichmäßig reagiert, und daß selbst chemisch nahe verwandte Substanzen ganz verschieden gestaltete Formen bedingen. Es wurden nun Untersuchungen mit einer Reihe weiterer Organismen durchgeführt, um festzustellen, ob gewisse Übereinstimmungen in ihrem Verhalten Salzen gegenüber bestehen. Als Vergleichsorganismen wurden untersucht: *Bact. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. mycoides* (als typischer Kettenbildner) und einige *Proactinomycceten* aus der Gruppe „*ruber*“ (wegen des normalerweise sehr bald zerfallenden Mycels).

Zusammenfassend ist mitzuteilen, daß *Bact. coli* auf Salznährböden sehr schlecht wächst, in Einzelfällen Langstäbchen ausbildet, sehr selten Kurzketten ( $\text{RbCl}$  0,5—0,7 mol/Liter 7  $\mu$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,4 mol/Liter 4  $\mu$ ,  $\text{CsCl}$  0,05—0,07 mol/Liter 5  $\mu$ ).

*Bac. fluorescens* verhält sich ähnlich wie *Bact. prodigiosum* und bildet bei etwa den gleichen Salzkonzentrationen Fäden und Ketten aus.

*Bac. mesentericus* ist gegen Salzeinwirkung etwas resistenter, kann aber auch in bestimmten Fällen Kettenform annehmen (NaCl 1,20 mol/Liter 25  $\mu$ , CsCl 0,09 mol/Liter 25  $\mu$ , NH<sub>4</sub>Cl 0,60 mol/Liter 25  $\mu$ ). Interessant ist seine Reaktion auf Lithiumsalze; hier werden entgegen allen Beobachtungen bei den übrigen untersuchten Bakterien längere Fäden ausgebildet (30  $\mu$ ). Es ist anzunehmen, daß die kolloidchemische Zusammensetzung des Plasmaeiweißes von *Bac. mesentericus* eine andere ist als beispielsweise von *Bac. prodigiosum*.

Bei *Bac. subtilis* wird lediglich die Versporung durch Salzgaben verzögert oder völlig gehemmt, die ursprüngliche Kettenform wird beibehalten und die Einzelglieder in ihren Längendimensionen nicht verändert.

*Bac. mycoides* und ebenso die *Proactinomycceten*-Stämme sind gegen Salzzusätze außerordentlich resistent. Es werden erheblich höhere Salzmengen vertragen (z. B. für *Bac. mycoides*: 2,10 mol/Liter NaCl, 2,50 mol/Liter KCl, 1,40 mol/Liter NH<sub>4</sub>Cl, eine gesättigte K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung), ohne daß Wachstumsstillstand oder eine Zellveränderung stattfindet. Nur bei LiCl und MgCl<sub>2</sub> wurden Involutionsformen beobachtet. Für *Proactinomycceten* haben die Grenzkonzentrationen die Werte: LiCl = 0,8 mol/Liter, NaCl = 1,6 mol/Liter, KCl = 1,8 mol/Liter, RbCl = 0,7 mol/Liter, CsCl = 0,01 mol/Liter, NH<sub>4</sub>Cl = 1,2 mol/Liter. Bei Überschreitung dieser Konzentrationen tritt Wachstumsstillstand ein, ohne daß eine morphologische Veränderung vorausgeht.

Insbesondere treten bei *Bac. mycoides* niemals Fäden, sondern stets nur Ketten auf, also auch bei Cäsium-Zusatz, wobei *Bact. prodigiosum* querwandlose Fäden bildet.

An *Bac. mycoides* wurden nun noch Untersuchungen zur Erlangung kettenfreier Kulturen vorgenommen. Daß eine Möglichkeit dazu besteht, geht aus den Arbeiten von STAPP und ZYCHA (1931), HOLZMÜLLER (1909) sowie ROELCKE und INTLEKOFER (1938) (über *Bac. anthracis*) hervor, welche Umbildungen der R-Form mit langen Zellketten in die S-Form mit kürzeren Zellformen beschreiben.

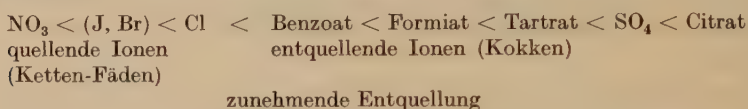
Die allmähliche Umbildung der Kettenform in die Stäbchenform gelang bei regelmäßigem Überimpfen mindestens drei Wochen alter Kulturen (also nicht bei Überimpfung junger Kulturen) auf Substrate mit hohem Kohlenstoff- (2% Dextrose) und hohem Stickstoffgehalt (0,60% Pepton). Die Stäbchenform (S-Form) hat dann die Fähigkeit, in den für *Bac. mycoides* charakteristischen und makroskopisch sehr gut sichtbaren Spiralwindungen zu wachsen, verloren, während die *Mycoides*kulturen auf stickstoffarmem Nährboden mit 0,10% Pepton

die Spiralwindungen weiter fortführen. Die Stäbchenform ist wieder in die Kettenform überführbar, wenn man auf Kartoffelagar (0,06% Stickstoff) oder stickstoffarmen Dextroseagar zurückimpft.

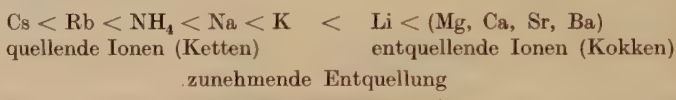
### Besprechung der Ergebnisse.

Bei den Alkalisalzen behauptet sich der Einfluß der Anionen noch verhältnismäßig stark, bei den Erdalkalisalzen überwiegen dagegen die Kationeneigenschaften.

Die zu einer Ketten- oder Fadenbildung von *Bac. prodigiosum* notwendigen Salzkonzentrationen oder, kolloidchemisch gesprochen, die zunehmende Entquellungsfähigkeit der Salze nimmt zu gemäß der Anionenreihe:



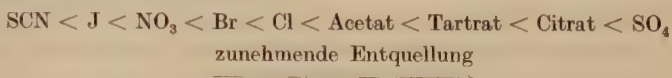
bzw. der Kationenreihe:



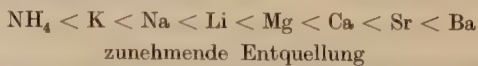
Zu diesen Ionenreihen ist noch zu bemerken, daß sich die Stellung der Säureradikale der organischen Säuren und des  $\text{SO}_4$ -Ions und in der Kationenreihe die Reihenfolge der Erdalkalien auf die Konzentrationen bezieht, bei welchen eine Entquellung (Kokkenform) mikroskopisch sichtbar wird. (Bei den quellenden Ionen kann daneben auch noch die Kettenlänge berücksichtigt werden.) Das bedeutet: für Citrat und Barium liegen die Salzkonzentrationen, die zu einer Entquellung führen, am tiefsten; sie sind die stärksten entquellenden Ionen. Umgekehrt quellen  $\text{NO}_3$  und Cs am stärksten, die notwendigen Salzmengen sind auch hier am geringsten.

Diese für die vorliegenden Versuche aufgestellten Ionenreihen stimmen zwar nicht völlig, aber in großen Zügen mit den Anionen- und Kationenreihen überein, wie sie HOFMEISTER für die quellende und entquellende Wirkung auf Eiweißkörper aufgestellt hat.

Hofmeistersche Anionenreihe:



Hofmeistersche Kationenreihe:



Mit zunehmender Quellung erhöht sich die Gesamtvitalitätshemmung, äußerlich erkennbar an Teilungssistierung (= Fadenbildung), gesteigerter

Schleim- und verminderter Farbstoffbildung sowie abnehmender Bewegungsintensität. Die Plasmaquellung wird demnach durch Ionen verschieden stark beeinflußt; die Permeabilität folgt diesen Veränderungen in spezifischer Art.

Die Resistenz der Bakterienzelle gegenüber Sulfatzusätzen erklärt sich wahrscheinlich aus der Eigenschaft des  $\text{SO}_4$ -Ions, eine große Hydratationshülle zu bilden; infolgedessen werden andere gelöste Stoffe, z. B. Zucker, intensiv aus der Lösung heraus in die Zelle hinein verdrängt, d. h. ein  $\text{SO}_4$ -Zusatz kann zu einer Umsatzsteigerung führen. Tatsächlich kann man bei Kulturen mit höchstmöglichen Sulfatkonzentrationen noch üppiges, den Kontrollkulturen zumindest entsprechendes, wenn nicht gar überlegenes Wachstum feststellen. Eine Ausnahme machen Cäsium- und Ammoniumsulfat. Daneben setzt das  $\text{SO}_4$ -Ion durch sein Entquellungsvermögen die Permeabilität herab, so daß es praktisch kaum zu einem erheblichen Eindringen des Salzes und damit zu einer störenden Beeinflussung des Wachstums- und Teilungsmechanismus kommen kann (vgl. WÄLTER).

Zu einer Erklärung der Kettenbildung in Cäsium- und Ammoniumsulfatmedien sei nochmals auf die außerordentlich hohe Toxizität der beiden Kationen verwiesen, welche vielleicht den oben erwähnten Eigenschaften des Sulfations entgegenwirken. Bei Anwendung von Lithiumsulfat addieren sich die entquellenden Eigenschaften von Anion und Kation, wobei dem Kation die stärkere Toxizität zukommt.

In den vorangehenden Versuchsbesprechungen ist bereits erwähnt worden, daß Bakterienketten schon nach wenigen Kulturtagen in ihre Einzelglieder zerfallen, während die Fäden ihre Form beibehalten. Diese Erscheinung läßt sich vielleicht folgendermaßen deuten:

Bei Salzzusatz wird durch kolloidchemisch beeinflusste Vorgänge in einer primären Phase der Teilungsmechanismus verlangsamt, während das Streckungswachstum ungehemmt fortschreitet. Dadurch kommt es nicht zur endgültigen Abtrennung der bei der Teilung entstehenden Einzelindividuen, und es werden Ketten gebildet, deren Glieder aus Stäbchen (1—2  $\mu$  lang, 0,5  $\mu$  breit) bestehen. In der darauffolgenden Sekundärphase wird das Längenwachstum gehemmt, während die Teilung, wenn auch verlangsamt, noch zu Ende geführt wird. Die Ketten zerfallen durch Bildung einer Scheidewand in ihre Einzelglieder, welche sich aber durch größere Länge von den Kontrollkulturen ohne Salzzusatz unterscheiden. Die Sekundärphase wird nach 2, höchstens 3 Kulturtagen erreicht, es sei denn, daß eine längere Inkubationszeit (NaCl, KCl) vorausgeht<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Bei der Korrektur zugefügt: C. N. HINSHELWOOD (The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell. Oxford 1947) stellt für das Auftreten von Ketten bei *Bact. lactis aerogenes* und deren späteren Zerfall die Theorie auf, daß unter be-



Bei Anwendung sehr hoher Salzkonzentrationen kommt es zur Ausbildung von Fäden. In diesen Fällen scheint der Teilungsmechanismus vollständig unterdrückt zu sein, während das Längenwachstum intensiver verläuft als bei den Normalkulturen. Später wird das Wachstum verlangsamt, ohne daß Teilungserscheinungen auftreten. Die Fäden können demnach nicht in Teilstücke zerfallen, sondern bleiben bis zum Absterben in dieser Form erhalten; die Teilung ist endgültig gehemmt.

Hier ist auch noch auf folgende bedeutsame Tatsache hinzuweisen. Ein Salz kann nur dann in spezifischer Konzentration auf die Ausbildung der Kettenform wirken, wenn es innerhalb der logarithmischen Phase der Bakterienentwicklung, also während der ersten acht Stunden zugegeben wird. Spätere Salzgaben verändern die Form der Organismen nicht mehr, auch wenn die Bakterienentwicklung noch nicht abgeschlossen ist. Dabei findet ein allmählicher Übergang von der Fadenform über die Kurzkettenform zur Langstäbchenform statt. Das bedeutet, am Beispiel des Cäsiumsulfates (0,04 mol/Liter) betrachtet, daß man bei Salzgaben bis zu 3 Std nach der Beimpfung lange Fäden erhält, bis zu 6 Std nach der Beimpfung Kurzketten und schließlich nur noch Langstäbchen (Tab. 8).

Tabelle 8. Zeitliche Abhängigkeit der Salzzugabe (0,04 Mol./l  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ ) nach der Beimpfung bei *Bact. prodigiosum*.

Salzzugabe	Mikroskopisches Bild am 2. Kulturtag		
	B. Form	Länge	Wachstum
vor der Beimpfung . . . . .	Ketten	30—75 $\mu$	+—
$\frac{1}{2}$ Std nach Beimpfung . . . . .	Fäden	30—75 $\mu$	+—
1 „ „ „ . . . . .	Fäden	30—75 $\mu$	+—
2 „ „ „ . . . . .	Fäden	15—50 $\mu$	+—
4 „ „ „ . . . . .	Kurzketten	10 $\mu$	+
6 „ „ „ . . . . .	Kurzketten	2—7 $\mu$	+
8 „ „ „ . . . . .	Kurzketten	2—7 $\mu$	+
12 „ „ „ . . . . .	Langstäbchen	2 $\mu$	++
24 „ „ „ . . . . .	Langstäbchen	2 $\mu$	++

stimmten Voraussetzungen alleinige Hemmung der Teilung erfolgt, während das Längenwachstum unbeeinflusst bleibt. Im Laufe der Bakterienentwicklung adaptiert sich der für die Teilung verantwortliche Faktor (ein Enzymsystem) an das ungewohnte Medium und das Gleichgewicht Teilung: Wachstum wird wieder hergestellt, mit dem Resultat des Kettenzerfalls.

Diese Hypothese kann aber für *Bact. prodigiosum* nur begrenzt Anwendung finden, da eine allmähliche Adaptation der Kulturen durch Überimpfen an Salznährböden nicht beachtet wurde. Auch von HINSHELWOOD werden derartige Versuche nur vereinzelt beschrieben. Deshalb scheint der Begriff Adaptation im Sinne einer Wiederbelebung des Teilungsfaktors nicht ganz gerechtfertigt zu sein, denn sonst müßten die gleichen Kulturen beim Überimpfen auf Salznährböden entweder normal wachsen oder zumindest mit verringerter Inkubation oder beschleunigtem Kettenzerfall.

Zwei hypothetische Erklärungsmöglichkeiten könnten für diese Tatsache Geltung finden: 1. Die Bakterienzelle wird in den ersten Entwicklungsstunden durch Stoffwechsel und Teilung derart beansprucht, daß sie nicht vermag, zusätzlich Abwehrmaßnahmen gegen die Salzeinwirkung auszuführen (eventuell durch Bildung oder Aktivierung eines Stoffes, der einer Kettenbildung entgegenwirkt). 2. Die Kettenbildung ist  $p_H$ -abhängig; es wurde ja oben erwähnt, daß sie durch saure Reaktionen gehemmt wird.

Im ersten Fall müßte in alten Normalkulturen der angenommene Antikettenstoff angereichert sein (wie v. DENFFER bei alternden *Diatomeen*-Kulturen einen Teilungshemmstoff nachweisen konnte) und, isoliert, jungen Salzkulturen zugesetzt werden können. Theoretisch dürften dann keine Ketten bei Salzkulturen entstehen. Umgekehrt müßte in Salzkulturen ein typischer, die Kettenbildung begünstigender Stoff ausgebildet und angereichert sein, und ein Konzentrat bakterienfreier<sup>1</sup> älterer Salzlösung müßte, Normalkulturen zugesetzt, die Kettenbildung fördern. Beide Möglichkeiten wurden untersucht. Die Versuche verliefen jedoch negativ.

Man könnte weiterhin annehmen, daß Kulturflüssigkeiten typischer Kettenbildner (als Prototyp wurde *Bac. mycoides* verwandt) eine die Kettenbildung begünstigende Substanz enthalten. Aber weder in bakterienfreiem *Mycoides*-Filtrat noch in durch Dialysemembran getrennten Doppelkulturen von *Bac. mycoides* und *Bact. prodigiosum* konnte bei letzterem ein Kettenwachstum (auch kein Fadenwachstum) festgestellt werden; die Kulturen zeigten keine Abweichung von der Normalkultur.

Die zweite Hypothese, die Vermutung einer  $p_H$ -Abhängigkeit der Kettenbildung, stand mit den Versuchsergebnissen in befriedigenderem Einklang. Der  $p_H$ -Wert einer ungepufferten Normalkultur fällt im Laufe der ersten 24 Std von 7,2 auf 5,2. Dabei ändert er sich in den ersten 7 Std nicht und sinkt dann innerhalb 18 Std auf seinen Endwert ab. Die Fadenlänge nimmt aber nach 2—7 Std bereits beträchtlich ab, bevor also ein meßbarer  $p_H$ -Abfall der Kulturlösung aufgetreten ist. Die Vermutung liegt nahe, daß schon 2 Std nach der Beimpfung innerhalb der Bakterienzelle, stoffwechselphysiologisch bedingt, eine  $p_H$ -Änderung stattfindet, durch welche die Teilungs- und Wachstumsvorgänge bereits beeinflußt werden.

Es sei an dieser Stelle auf eine Literaturangabe von SCHARDINGER verwiesen, der einen Kettenzerfall in salzsaurer Lösung beschreibt. Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß auch der Kettenzerfall bei *Prodigiosum*-Kulturen nach 1—3 Tagen Kulturdauer auf dem Absinken des  $p_H$ -Wertes beruht. Der Zeitpunkt des Kettenzerfalls ist

<sup>1</sup> Keimfreie Filtration durch Membranfilter.

von dem angewendeten Salz und seiner Konzentration abhängig, denn verständlicherweise geht in Salzmedien die Bakterienentwicklung und damit der  $p_H$ -Abfall langsamer vonstatten (Tab. 9).

Tabelle 9. Abhängigkeit des Kettenzerfalls vom  $p_H$ -Wert der Nährlösung.

mol/Liter Salzgabe	$p_H$ -Wert nach				Kettenzerfall nach
	12 Std	24 Std	36 Std	48 Std	
$Cs_2SO_4$ 0,010 . .	6,0	5,5	5,3	5,2	24 Std
$Cs_2SO_4$ 0,020 . .	6,8	5,8	5,2	5,2	36 Std
$KNO_3$ 0,3 . . .	5,8	5,8	5,8	5,8	7 Tagen ( $p_H = 5,2$ )
$NaNO_3$ 0,3 . .	6,9	6,5	6,3	6,1	7 Tagen ( $p_H = 5,2$ )
Salzfr. Kontrolle	5,7	5,2	5,2	5,2	—

Werden *Prodigiosum*kulturen, die in salzhaltigen Medien in Ketten gewachsen sind, auf normalen Dextroseagar zurückgeimpft, so bilden sie wieder Kurzstäbchen aus. Es wurde daraufhin untersucht, ob es möglich ist, Kulturen zu erzielen, die sowohl auf normalem Dextroseagar als auch bei bestimmter Salzkonzentration in der gleichen Form wachsen. Hierfür waren zunächst 2 Möglichkeiten gegeben, die beide untersucht wurden. 1. Durch stufenweise Adaptation an langsam ansteigende Salzkonzentrationen sollten Stämme entstehen, die stets die Stäbchenform beibehielten. 2. Bakterienkulturen wurden über zahlreiche Generationen stets auf salzhaltigen Nährböden in Fäden gehalten, in der Hoffnung, sie würden durch Gewöhnung an dieses Medium die Fähigkeit, auf normalem Agar wieder Stäbchen zu bilden, verlieren.

Beide Versuche erstreckten sich über einen Zeitraum von 20 Monaten. Sie blieben jedoch völlig erfolglos in dem Sinn, daß es nicht gelang, Stämme zu erhalten, die sowohl in Salzmedien als auch auf normalem Agar die gleiche Form auszubilden vermögen.

Parallel mit der Wachstums- und Teilungshemmung verläuft eine allgemeine Herabsetzung der Vitalität und damit verbunden eine Verminderung der Farbstoffbildung und eine Steigerung der Schleimproduktion. Mit sehr geringen Ausnahmen ( $KBr$ ,  $KNO_3$ ,  $NaNO_3$ ) sind alle durch Salzzusätze erzielten Faden- und Kettenkulturen weiß oder höchstens mattrosa gefärbt, und man erhält analog den verschiedensten Übergangsformen vom Kokkenstäbchen zur Kurzkette alle Zwischenstufen von ziegelrot über rosa nach weiß. Eine bestimmte Zellform ist dabei nicht gleichzusetzen mit einem besonderen Farbton, sondern jedes Salz wirkt einmal auf die Form, zum andern auf die Farbe spezifisch.

Die Schleimbildung steigt mit der Konzentration der zugesetzten Salze an. Sicher ist die Schleimhülle nicht bedeutungslos für den späteren Zerfall, und es ist leicht einzusehen, daß ein beträchtlicher Energieaufwand nötig wird, um bei der Teilung den Widerstand der viscosen

Schleimschicht zu überwinden. Die Ausbildung einer Schleimschicht bedingt vielleicht ferner die außerordentlich gestreckte Form der langen Fäden, wie sie z. B. bei Zusätzen von  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  vorliegen.

Salzkulturen sind ausnahmslos unbeweglich, nur bei ganz geringen Salzzugaben wird der Geißelapparat nicht geschädigt. Der Hemmungsgrad ist abhängig von der chemischen Eigenart des angewandten Salzes, und man kann für den speziellen Fall bei *Bact. prodigiosum* eine der Hofmeisterschen Reihe verwandte Hemmungsreihe für den Geißelapparat aufstellen, wie sie von WEINLAND für die Flimmerepithelbewegung in der Rachenschleimhaut des Frosches gefunden wurde:

Anionen:  $\text{SO}_4 < \text{Tartrat} < \text{Cl} < \text{NO}_3 < \text{Br}$   
 zunehmende schädigende Wirkung

Kationen:  $\text{K} < \text{Na}, \text{Rb} < \text{NH}_4 < \text{Li} < \text{Cs}$   
 zunehmende schädigende Wirkung

### Zusammenfassung.

Zusätze von Salzen der verschiedensten Kationen und Anionen führen bei *Bacterium prodigiosum* zur Ausbildung von normalen Einzelzellen oder mehr oder weniger langen Ketten und Fäden. Die Ausbildung der jeweiligen Form richtet sich nach der Stellung des Kations oder Anions in der Quellungsreihe; je stärker quellend das betreffende Ion wirkt, um so stärker tritt über die Kettenform die Fadenform in Erscheinung:

entquellend  $\longleftrightarrow$  quellend  
 Kokken    Ketten    Fäden

Kombination der Ionen bzw. ihrer Salze führt entweder zu einer Additivwirkung oder zu einer antagonistischen Wirkung.

Die Zugabe eines Salzes bleibt wirkungslos, wenn es später als 8 Std nach Beimpfung der Kultur zugegeben wird. Ursache ist die dann einsetzende Säurebildung, entsprechend der den Zerfall der Ketten begünstigenden Wirkung der Wasserstoffionen.

Für die Kettenlänge ist ein bestimmtes Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis maßgebend; die Ketten- bzw. Fadenbildung auslösende Salzmenge kann jedoch durch dieses Verhältnis nicht beeinflußt werden.

Ähnlich verhielten sich *Pseudomonas fluorescens* und, etwas abgeschwächt, *Bacterium coli*. *Bacillus mesentericus* zeigte nur in bestimmten Fällen entsprechende Reaktion, jedoch — im Gegensatz zum Verhalten der übrigen Bakterien — Ausbildung von Fäden bei Zusatz von Lithiumsalzen.

*Bacillus subtilis* und ein *Proactinomyces* zeigten keinerlei Beeinflussbarkeit. Auch *Bacillus mycoides* reagierte im allgemeinen nicht, doch



gelang es bei ihm, durch dauernde Überimpfung 3 Wochen alter Kulturen auf Nährboden mit hohem Dextrosegehalt, Wachstum in Einzelzellen zu erzielen.

Versuche, teilungsfördernde oder teilungshemmende Stoffe in Bakterienkulturen nachzuweisen, verliefen negativ.

### Literatur.

EISENBERG, P.: C. f. Bakt. II 82, 69 (1919). — v. DENFFER, D.: Biol. Zbl. 67, 7 (1948). — HOFMEISTER, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 25, 13 (1888); 28, 210 (1891). — HOLZMÜLLER, K.: C. f. Bakt. II 23, 304 (1909). — MINOUX, M.: La forme des bactéries. Thèse Nancy 1927. — PÉJU u. RAJAT: C. f. Bakt. Ref. 42 11 (1909); 39 266, 455, 457 (1907). — ROELCKE, K., u. H. INTLEKOFER: C. f. Bakt. Org. 142, 42 (1938). — ROLIN, M.: La forme des bactéries. Influence de quelques facteurs physicochimiques sur la morphologie. Thèse Nancy 1929. — SCHARDINGER, F.: C. f. Bakt. II 8, 144 (1902). — SCHMUCKER, TH.: Planta 23, 264—283 (1935); Naturwissensch. 20, 839 (1932). — STAPP, C., u. G. RUSCHMANN: Arb. biol. Reichsanst. Land- u. Forstwirtschaft. 13, 305 (1920). — STAPP, C., u. H. ZYCHA: Arch. f. Mikrobiol. 2, 493 (1931). — WALTER, H.: Die Grundlagen des pflanzlichen Lebens. Stuttgart 1947, 67 u. 79. — WEINLAND, G.: Pflügers Arch. 58, 105 (1894).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

## Oxalsäure als Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen\*.

Von

HANNELORE MÜLLER.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Mai 1949.)

Oxalsäure ist bei höheren und niederen Pflanzen eines der am häufigsten gebildeten Stoffwechselprodukte; ihre Verarbeitung muß in der Natur eine nicht unwichtige Rolle spielen. Da aber andererseits die Säure bzw. oxalsäure Salze stark giftig wirken, so ist zu erwarten, daß für diese Verarbeitung besondere Spezialisten in Frage kommen. Die bisher vorliegenden Erfahrungen sind wenig umfangreich. Sieht man von vereinzelten Angaben ab, die später noch zu erwähnen sein werden, sowie von der Tatsache, daß ein enzymatischer Abbau der Oxalsäure verschiedentlich bei Organismen festgestellt wurde (einige Literatur bei NORD-WEIDENHAGEN), so liegt nur eine eingehendere Arbeit von BASSALIK vor, der 1913 ein mit blutrotem Farbstoff wachsendes Bakterium, *Bacillus extorquens*, aus Regenwurmexkrementen und Boden isolierte, das ein ausgesprochener Oxalsäurezersetzer sein soll. Die eigenen Untersuchungen knüpften an eine Beobachtung von W. FISCHER an, wonach bei anscheinend reinen Kulturen von *Azotobacter chroococcum* in einer Natriumoxalat enthaltenden Lösung (in der *Azotobacter* abstirbt) ein gegen Oxalsäure resistenter Organismus aufgefunden wurde, dessen weiteres Verhalten gegen Oxalsäure aber nicht untersucht wurde.

### Methode der Isolierung.

Als Nährlösung zur Isolierung wurde folgende, Natriumoxalat als einzige Kohlenstoffquelle enthaltende, verwendet: Natriumoxalat 1,0%,  $\text{KNO}_3$  0,3%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1%,  $\text{MgSO}_4$  0,05%,  $\text{FeSO}_4$  0,005%. pH-Wert 7,2. In einem Reagensglas wurden 7 cm<sup>3</sup> mit den verschiedensten, in Tab. 1 angegebenen Proben aus Boden, Wasser usw. geimpft. In allen, mit Ausnahme von Leitungswasser, war bereits nach 24 Std eine Trübung zu erkennen; später bildete sich ein Bodensatz. Durch wiederholtes Überimpfen 48 Std alter Kulturen, die in gleicher Weise wuchsen, wurde die Rohkultur weiter gereinigt, und schließlich wurde auf Schrägröhrchen mit 1,5% Agar, 0,6% Pepton, 0,8% Probacit (der Maggi-Werke), 0,5% Glykose übergeimpft. Später wurde, was sich als vorteilhaft erwies, die Glykose durch Glycerin ersetzt. Diese Kulturen wuchsen gut mit schmutzig weißer bis gelblicher Farbe (soweit später nicht anders angegeben ist). Die Prüfung auf Oxalsäure zeigte in allen

\* Auszug aus der gleichnamigen Dissertation, Göttingen, mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, 1949.

Flüssigkeitskulturen mit Natriumoxalat als einziger Kohlenstoffquelle, wie oben angegeben, sowohl in Rohkulturen wie in Überimpfungen von den Agar-Schrägröhrchen den Verbrauch des Oxalats an.

Quantitativ wurde das Oxalat in bekannter Weise durch Fällung mit Chlorcalcium und Titration mit Kaliumpermanganat bestimmt.

### Verbreitung.

Wie Tab. 1 zeigt, sind die oxalsäurezersetzenden Mikroorganismen allgemein verbreitet und kommen auch im Wasser vor, in dem nach v. PLOTTO *Proactinomyces*, um die es sich, wie noch auszuführen sein wird,

Tabelle 1. *Herkunft der Oxalsäurezerersetzer.*

Nr.	Örtlichkeit	Farbe des isolierten Stammes
1	Gartenerde, Institut . . . . .	weiß
2	Tabakfeld, Institut . . . . .	weiß
3	Komposterde, Institut . . . . .	weiß, rot, gelb
4	Gartenerde, Institut . . . . .	grau-weiß
6	Tümpel im Hainberg, eutroph . . . . .	weiß, rot
7	Elbufer bei Hölbeck, Kiefern/Heide . . . . .	weiß
8	Fichtenbestand bei Einbeck . . . . .	weiß
9	Gartenerde, Institut . . . . .	weiß, rosa, gelb
10	„ „ . . . . .	weiß
11	„ „ . . . . .	weiß
12	Komposterde, Institut . . . . .	weiß
13	„ „ . . . . .	weiß
14	Gartenerde, Institut . . . . .	weiß
15	Ackerboden, Kerstlingerode bei Göttingen . . . . .	weiß
16	Eichenwald, Umgebung von Göttingen . . . . .	weiß-blau, gelb, rot
17	Erlen-Kiefernbestand, Göttinger Wald . . . . .	weiß
18	Mischwald, Göttinger Wald . . . . .	weiß
19	Fichtenbestand, Einbecker Wald . . . . .	weiß
20	Kahlschlag, Einbecker Wald . . . . .	nach Isolierung eingegangen
21	Kartoffelfeld, Einbeck . . . . .	weiß
22	Hafer-Stoppelfeld, Einbeck . . . . .	weiß, gelblich
23	Buchenwald, Einbeck . . . . .	weiß
24	Kiefernbestand, Einbeck . . . . .	weiß, gelblich
26	Aus <i>Azotobacter</i> -Kultur nach FISCHER . . . . .	rot
28	Leinewasser, klar . . . . .	weiß, blaß rosa
29	Kläranlage, Göttingen . . . . .	weiß, blaß rosa, gelb
30	Leinewasser, mäßig trüb . . . . .	weiß
31	Leitungswasser, Göttingen . . . . .	—
32	Abwasser, Göttingen . . . . .	weiß, gelb
33	Leinewasser . . . . .	weiß, rosa, rot
34	Erde unter vermoderndem Baumstumpf . . . . .	stark rosa, weiß
35	Humose Erde aus Eichenstumpf . . . . .	weiß, rosa
36	Pansen eines Schafes . . . . .	weiß
37	Schafjauche . . . . .	weiß, rosa
38	Regenwassertonne . . . . .	weiß, gelb
39	Komposterde, Institut . . . . .	weiß, gelb
40	Institutskultur von <i>Proactinomyces citreus</i> . . . . .	weiß, rot

handelt, nicht vorkommen sollen, während KRASSILNIKOV diese Gruppe in Wolgawasser feststellte. Die Jahreszeit hatte auf das Vorkommen keinen Einfluß. Bemerkenswert erscheint die Isolierung aus dem Pansen eines Schafes. Bei Fütterung mit stark oxalsäurehaltigem Material, etwa Rübenblättern, kann bekanntlich bei Wiederkäuern Knochenweiche auftreten. Ob der Organismus allerdings im Pansen an der Zerstörung der Oxalsäure beteiligt ist, kann hier nicht entschieden werden. Erwähnt sei in diesem Zusammenhange, daß in eingesäuerten Rübenblättern eine Zerstörung von Oxalsäure festgestellt wurde.

### Die isolierten Mikroorganismen.

#### Begleitorganismen:

Keiner der isolierten Rohstämme zeigte von Anfang an die blutrote, von BASSALIK beschriebene Farbe, obwohl dieses Bakterium im Boden verbreitet sein soll. Jedoch trat bei 4 Stämmen nach längerer Kulturdauer auf Agar ein roter Organismus auf, der dann entweder sofort die ganze Fläche blutrot überzog oder mit kleinen roten Zonen an der Grenze der Impffläche erschien. Weiße und rote Stämme ließen sich daraus isoliert herauszüchten und blieben konstant. Es handelt sich zweifellos um den von BASSALIK beschriebenen Organismus, zumal dieser Autor angibt, daß seine Kulturen erst schmutzig gelblich bis gelbrötlich wuchsen und erst allmählich in den blutroten Zustand übergingen. In 25 cm<sup>3</sup> der oben erwähnten Oxalsäurenährlösung in 100 cm<sup>3</sup> ERLÉNMEYER-Kölbchen zeigte der rote Stamm jedoch keinerlei Entwicklung und keine Zersetzung der Oxalsäure, im Gegensatz zu dem weißen Stamm, der vollständig abbaute. Es kann sich bei dem roten Organismus also nicht um einen Oxalsäurezerersetzer handeln. Besondere Versuche zeigten, daß der rote Organismus sich langsamer entwickelte als der weiße und auf Agar etwa 3 Tage später erschien als dieser. Es ist also das Vorhandensein des roten Organismus in einer weißen Kultur von Anfang an nicht ohne weiteres zu erkennen.

Wie hartnäckig das Weiterschleppen des roten Organismus sein kann, zeigte sich an einem einige Jahre im Institut geführten Stamm von *Proactinomyces citreus*, bei dem ebenfalls, nach Jahren also, der rote Organismus zum Vorschein kam.

Der Farbstoff des roten Organismus ist, bei Ausschütteln der Agarkultur, unlöslich in Wasser, löslich in Chloroform (gelb-orange), Methanol (gelb-rosa), Äther (gelb), Benzol (gelb in auffallendem, gelb-rosa in durchfallendem Licht), Aceton (gelb-orange). Morphologisch und färbend zeigte sich, von der Farbstoffbildung und dem Fehlen der Oxalsäurezerersetzung abgesehen, keine wesentliche Verschiedenheit von den weißen Stämmen.



Weiter traten in 9 Fällen gelbe Stämme auf. Auch dieser Organismus tritt erst später in der weißen Kultur hervor und wächst langsamer als diese. Die gelben Stämme greifen Oxalsäure ebenfalls nicht an, verhalten sich aber morphologisch wie die weißen.

In 7 Fällen erschienen neben den weißen Stämmen solche von rosa Farbe, die ebenso schnell wachsen wie die weißen Stämme, wie diese Oxalsäure zersetzen und ihnen morphologisch und färberisch gleichen. Die rosa Farbe nahm jedoch, bis auf einen Stamm, im Laufe der Zeit bei den wiederholten Überimpfungen ab; diese Stämme zeigten dann eine einheitliche weiße Farbe. Eine Verunreinigung lag hier offenbar nicht vor, da sich bei zahlreichen Plattenisolierungen, im Gegensatz zu den roten Stämmen, stets ein einheitliches Bild ergab.

Endlich wurde versucht, die, wie eingangs erwähnt, in *Azotobacter*-Kulturen von W. FISCHER auftretenden Bakterien zu isolieren. Es handelte sich dabei um einen anfangs mit gelblich-rostiger, nach öfterem Überimpfen mit krebserotter Farbe wachsenden Organismus, der morphologisch in die Gruppe der weißen Stämme gehörte, aber keine Oxalsäure zersetzt. Er zeichnet sich also lediglich durch Resistenz gegen Oxalsäure aus.

### Die weißen Stämme.

*Proactinomyces citreus*-Gruppe. Das Hauptaugenmerk wurde auf die weißen Oxalsäurezersetzer gerichtet. Das zunächst verwirrende morphologische Bild zeigte bei stündlicher, tagelang durchgeführter mikroskopischer Kontrolle mit dem charakteristischen, aber zu bestimmten Zeiten ziemlich konstanten Wechsel der Formen ganz das Bild eines *Proaktinomyceten*, der zweifellos in die Gruppe des *Proactinomyces citreus* gehört. Auch diese Art, die an einem Institutsstamm vergleichend untersucht wurde, zersetzt Oxalsäure, entgegen der Angabe von V. PLOTTO.

Die Kolonien sind von cremeartiger Beschaffenheit. In Oxalatnährlösung ist der Boden des Kölbchens nach 2 Tagen mit einer dünnen Schleimschicht bedeckt, die sich später zu einem dicken, ziehenden, weißlichen oder gelblichen Bodensatz ausbildet.

Das morphologische Bild ist, zeitlich gesehen, nicht immer ganz einheitlich, selbst nicht bei dem gleichen Stamm. Zu Beginn der Entwicklung (auf Glycerinagar) treten meist Stäbchen von verschiedener Länge, bis zu  $12,5\ \mu$ , auf, zum Teil winklig gelagert und teilweise mit deutlichen Verzweigungen (Abb. 1 und 2). Im Verlaufe einiger Tage vollzieht sich, nachdem oft schon früher Kokken oder Kokkenstäbchen mit ein- oder beiderseitiger Polverdickung vorhanden waren, ein Formwechsel zu ausgesprochenen Kokken, Einzelkokken oder Diplokokken (Abb. 3). Doch kann immer noch ein polymorpher Zustand vorhanden

sein mit allen Übergängen zwischen Kokken und langen Stäbchen. Auf neuem Nährboden wächst der Einzelkokkus zu einem Stäbchen aus, während bei Diplokokken die beiden Pole gewissermaßen auseinanderdrücken und so ein Stäbchen entsteht.

Auf Glykose- und Glycerinagar und in flüssiger Glykoselösung sind die Zellen etwa gleich groß; in Oxalatnährlösung sind die Zelldimensionen etwas geringer. Der Organismus ist unbeweglich und aerob.



Abb. 1.



Abb. 2.

Abb. 1. *Proactinomyces*-Stamm 36. 30 Std alte Kultur auf Glycerinagar. Vergrößerung 648mal.

Abb. 2. *Proactinomyces*-Stamm 36. Wie Abb. 1. Vergrößerung 1080mal.

Alle Stämme verschiedenen Alters erwiesen sich als grampositiv, was mit den Angaben von GRAY und THORNTON, JENSEN sowie KRASSILNIKOV für *Proactinomyces* übereinstimmt, während v. PLOTHO für die gelben bis graugrünen Stämme diese Eigenschaft erst bei dem Auftreten der „Dauerformen“ angibt. — Die Mehrzahl der Stämme war säurefest, doch nicht alle mit gleicher Intensität. Insbesondere erwiesen sich die kondensierten Plasmazonen (Pole!) als äußerst resistent gegen die Entfärbung (vgl. v. PLOTHO, ferner LOMINSKI für *Tuberkelbakterien*). — Von Inhaltstoffen konnten bei Glycerinagar-Kulturen Iogen, Glykogen und Fett nicht nachgewiesen werden, jedoch überall Volutin, hauptsächlich in den plasmakondensierten Polen.

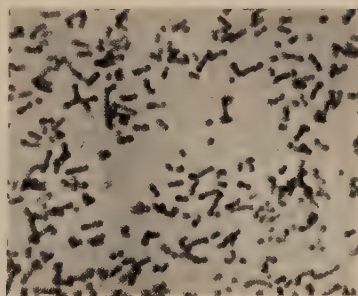


Abb. 3. *Proactinomyces*-Stamm 40. Perischnurartiges Endstadium. Vergrößerung 648mal.

Als bemerkenswerte Besonderheiten seien noch folgende erwähnt: Bei 2 Stämmen (9 und 33) trat auf Glycerinagar im Verlaufe des Wachstums eine

Bräunung des Agars auf. Mit Wasser ließ sich ein Farbstoff von hell goldgelber Farbe ausschütteln; die Reaktion war alkalisch.

Noch merkwürdiger verhielt sich der Stamm 16, der zunächst, etwa  $\frac{1}{2}$  Jahr, mit sauberer weißer Farbe wuchs, die dann plötzlich in kräftiges Tintenblau überging. Der Farbstoff wird in das Substrat ausgeschieden

und kann aus ihm mit Wasser extrahiert werden; bei Zusatz von Säure schlägt der Farbstoff in Rot um. Es erscheint möglich, daß es sich um den gleichen Organismus handelt, wie ihn BEIJERINCK, HANNE u. a. gefunden haben; ob der Farbstoff mit dem von BROCKMANN bei einem *Aktinomyces* untersuchten identisch ist, kann nicht gesagt werden. Auch hier schien es sich nicht um eine Verunreinigung zu handeln; die blaue Farbe verschwand später wieder bei einzelnen Überimpfungen in verschieden starkem Grade.

### Physiologische Eigenschaften der Oxalsäurezersetzer.

#### Einfluß von Temperatur und $p_H$ -Wert.

Das Optimum der Oxalsäurezersetzung liegt bei etwa 34° C. Auffallend ist der schnelle Leistungsabfall bei Senkung der Temperatur, wie Tab. 2 zeigt. Alle Stämme vertragen 5 min Erwärmen auf 60° C; bei 65° C sterben sie nach 1 min ab. Nur Stamm 16 ist etwas resistenter; er verträgt Erwärmen auf 75° C 1 min lang.

Tabelle 2. Temperatur und Oxalsäurezersetzung.

Temperatur ° C	Oxalsäure abgebaut in % nach Tagen		
	2	3	5
23	6,8	14,4	38,7
26	15,0	30,5	80,8
27	20,8	44,0	100,0
28	33,8	70,8	100,0
31	40,5	—	100,0
34	47,4	84,0	100,0

Infolge des Freiwerdens des Kations wird die Nährlösung bei dem Abbau der Oxalsäure alkalisch (Tab. 3). Alle diese Angaben beziehen sich auf Natriumoxalat, da besondere Versuche ergeben hatten, daß Kalium- und Ammoniumoxalat sich völlig gleich verhielten. Unter  $p_H$  6,5 tritt weder Organismenentwicklung noch Oxalsäurezersetzung auf. Das Optimum liegt fast genau bei  $p_H$  7,0. Doch entwickeln sich die Organismen weit in den alkalischen Bereich hinein, wenn auch etwas schwächer. So war beim Anfangs- $p_H$  8,5 nach 4 Tagen 50% der Oxalsäure abgebaut gegen 70% beim Anfangs- $p_H$  7,0. Wie Tab. 3 zeigt, geht die Oxalsäurezersetzung noch weiter, wenn der  $p_H$ -Wert durch das freiwerdende Kation auf über 9 gestiegen ist.

#### Anorganische und organische Stickstoffquellen.

Es wurden die in Tab. 3 angegebenen anorganischen N-Quellen (je 0,15% in der oben genannten Natriumoxalat-Nährlösung) geprüft,

von denen, wie man sieht, nach der Schnelligkeit des Abbaus der Oxalsäure Kaliumnitrat am besten wirkt, dann in abgestufter Reihenfolge Ammoniumnitrat, Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumchlorid. Dabei ist, wie man sieht, der  $p_H$ -Wert nicht entscheidend, der sich infolge des starken Basenüberschusses aus dem Natriumoxalat

Tabelle 3. Anorganische N-Quellen für Oxalsäurezersetzer.

N-Quelle	Trockengewicht in mg je Kölbchen mit 25 cm <sup>3</sup> Nährlösung	% Oxalsäure zersetzt		$p_H$ -Wert bei	
		50% nach Tagen	100%	50%	100%
Kaliumnitrat . . .	14,10 $\pm$ 1,50	4	8	9,3	10,2
Ammoniumnitrat .	8,75 $\pm$ 1,25	6	8	9,7	10,2
Ammoniumsulfat .	15,15 $\pm$ 0,85	6,7	10	9,4	10,2
Ammoniumphosphat	10,05 $\pm$ 2,55	7,5	10	9,2	10,2
Ammoniumchlorid .	9,80 $\pm$ 0,70	8,4	>10	9,4	10,2

ganz gleichmäßig ändert und schließlich bis zu 10,2 ansteigt, was gleichzeitig die außerordentliche Resistenz gegen alkalische Reaktion anzeigt. Daß Ammoniumchlorid am schlechtesten wirkt, entspricht den allgemeinen Erfahrungen. Wie Tab. 3 weiter zeigt, gehen jedoch die Trockengewichte (bestimmt nach 100%igem Verbrauch der Oxalsäure) dem Oxalatabbau nicht parallel, was namentlich beim Vergleich von Ammoniumnitrat mit Ammoniumsulfat oder Ammoniumchlorid deutlich wird. Gleichzeitig zeigt die Tabelle, daß der Stickstoffkonzentration keine besondere Bedeutung innerhalb weiter Grenzen zukommt.

In einer 1%igen Oxalatnährlösung war bei 0,15 und 0,3% Nitrat aller Nitratstickstoff verschwunden, nicht aber bei 0,5%. Da die gebildete Bakterienmasse 15 mg nicht übersteigt, so läßt sich leicht errechnen, daß nicht alles Nitrat zu Körperstickstoff verarbeitet wird.

Von organischen Stickstoffquellen wurden in der gleichen Natriumoxalat-Nährlösung Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Asparagin geprüft, jeweils in einer dem Stickstoffgehalt einer 0,113% Glykokoll entsprechenden Menge. Außer auf Asparagin wuchs keiner der geprüften 5 Stämme. Veränderung der Glykokollmenge auf 0,1 und 0,5% war ebenfalls wirkungslos. Man muß danach annehmen, daß im Asparagin lediglich der Amidstickstoff verwertbar ist. Allerdings wuchsen die verschiedenen Stämme auf Asparagin sehr verschieden stark, wie Tab. 4 zeigt. Die Höhe des ökonomischen Koeffizienten, die für Oxalat und anorganische Stickstoffquellen zu 4,5 gefunden wurde (siehe unten), zeigt, daß das Asparagin nicht angegriffen war, nur die Verarbeitung des Oxalats vielleicht ein wenig begünstigt wurde. Das geht auch aus dem kaum gestiegenen ökonomischen Koeffizienten hervor, wenn 0,3 statt 0,1% Asparagin verwendet wurde.



Tabelle 4. *Asparagin als Stickstoffquelle für Oxalsäurezer-setzer.*

Stamm	N-Quelle	Verbrauchte Oxalsäure mg	Trockengewicht mg	Ökonomischer Koeffizient
9	Asparagin 0,1%	250	12,55	5,0
9	„ 0,3%	250	14,70	5,9
29	„ 0,1%	78,5	nicht feststellbar	?
29	„ 0,3%	204,6	8,45	4,0

Daß die Aminosäuren bei Oxalsäure als Kohlenstoffquelle nicht als Stickstoffquelle verwertet werden können, hängt vielleicht damit zusammen, daß die Oxydation der Oxalsäure von der oxydativen Desaminierung der Aminosäure ablenkt, da beispielsweise Essigsäure eine gute Kohlenstoffquelle ist, also die Verwertbarkeit für Glykokoll zu erwarten wäre.

### Kohlenstoffquellen.

Natriumoxalat-Konzentration. Tab. 5 zeigt die Verarbeitung verschiedener Oxalatsmengen. Nach 2½ Tagen liegt die absolut stärkste Verarbeitung bei 3,5% Na-Oxalat. Sie geht aber nach 7 und 10 Tagen

Tabelle 5. *Zersetzung verschiedener Oxalatsmengen.*

Zugesetztes Oxalat in %	Verbrauchtes Oxalat in mg nach Tagen, in ( ) p <sub>H</sub> -Wert		
	2.5	7.0	10
0,5	19,2 (7,5)	125,0 (9,7)	
1,0	81,6 (8,9)	245,0 (10,0)	
2,0	83,2 (8,8)	367,6 (10,0)	500,0 (10,0)
3,0	158,4 (8,8)	321,8 (10,0)	379,4 (10,0)
3,5	260,1 (8,6)	279,0 (10,0)	317,4 (10,0)

25 cm<sup>3</sup> Nährlösung in 100 cm<sup>3</sup> Kölbchen. Die unterstrichenen Zahlen bedeuten 100 (oder fast 100)%igen Verbrauch.

nur unwesentlich weiter. Da offenbar der p<sub>H</sub>-Wert nicht entscheidend sein kann, so muß wohl eine Anhäufung von Stoffwechselprodukten als der hemmende Faktor angenommen werden. Am 7. und 10. Tage zeigt 2,0% Oxalat die absolut stärkste Verarbeitung. Relativ ist sie natürlich bei 0,5 und 1,0% stärker und schneller beendet. Jedenfalls ist erstaunlich, daß überhaupt noch 3,5% Oxalat merklich angegriffen zu werden vermag.

Von organischen Säuren wurden noch Ameisensäure, Essigsäure, Citronensäure, Milchsäure, Brenztraubensäure als Kohlenstoffquellen geprüft (Anfangs-p<sub>H</sub>-Wert 7,0—7,4). Eine merkliche Entwicklung trat nur bei Essigsäure ein, bei den übrigen höchstens eine äußerst geringe Trübung oder auch, wie bei Milchsäure, ein Sinken des p<sub>H</sub>-Wertes (von

7,0 auf 5,7), was die Ursache der schlechten Verarbeitung sein könnte. Bei Essigsäure stieg der  $p_H$ -Wert auf 8,4, bei Oxalsäure auf 9,2.

Glykose wird durch die Oxalsäurezersetzer ebenfalls verarbeitet, jedoch in verhältnismäßig geringem Umfange, z. B. bei 4 Stämmen mit je 2 Parallelen und 0,9% Glykose im Mittel zu 16,6%. Der Grund hierfür dürfte ebenfalls in der Säuerung des Substrates zu suchen sein. Der  $p_H$ -Wert war trotz 0,5% Nitrat als Stickstoffquelle auf 5,5 abgesunken.

Ökonomischer Koeffizient. Es interessierte nun die Höhe des ökonomischen Koeffizienten für Glykose und Oxalsäure. Leider sind sehr große Schwankungen festzustellen. Aus größeren Versuchsreihen wurden daher die Werte für 0,9%ige Glykoselösung berücksichtigt, wobei das Wachstum am besten war (4 Stämme mit je 2 Parallelen und *Proactinomyces citreus* mit 2 Parallelen), für Oxalsäure 6 Werte bei 100%igem Oxalatverbrauch (1%ige Oxalatnährlösung). Daraus ergaben sich, wobei in ( ) das Mittel aller Versuche hinzugesetzt ist, die folgenden Werte:

ökonom. Koeff. für Glykose	20,9 (15,1)
„ „ „ Oxalsäure	5,3 ( 4,3)

also ein Verhältnis von rund 4:1. Kalorisch stehen Glykose und Oxalsäure im Verhältnis 5,5:1; man kann also annähernd sagen, daß die ökonomische Ausnützung der beiden Stoffe etwa im Verhältnis ihrer kalorischen Wertigkeit steht<sup>1</sup>.

### Verwertung heterocyclischer C-N-Verbindungen.

Da *Proactinomyces* befähigt sind, heterocyclische Kohlenstoff-Stickstoffverbindungen zu verwerten (HORVATH, v. PLOTHO), so wurden solche Prüfungen vorgenommen, zugleich mit einigen Institutsstämmen und unter Hinzuziehung von Petroleum, das bekanntlich für *Mykobakterien* eine ausgezeichnete Kohlenstoffquelle darstellt. Die Prüfung geschah auf Agarplatten unter Zusatz von je 0,2% des betreffenden Stoffes, bei Petroleum (hier die Nährlösung nach SÖHNGEN mit Ammonchlorid als N-Quelle) in Form von Dämpfen aus einem danebenstehenden Schälchen. Die Nährlösung enthielt 2% Agar, 0,1%  $K_2HPO_4$ , 0,04%  $MgSO_4$ , 0,004%  $FeSO_4$ .

Das Ergebnis des Versuches zeigt Tab. 6. Von den weißen und rosa Stämmen, also den Oxalsäurezsetzern, wurden alle Stoffe gut verwertet; der blaue Stamm stand etwas zurück, die roten und namentlich

<sup>1</sup> Wahrscheinlich ist der ökonomische Koeffizient in der Oxalatnährlösung zu hoch, da infolge der Ammoniakbildung unlösliches Ammoniummagnesiumphosphat ausfallen muß, dessen zwar nur geringe Menge doch bei der ebenfalls geringen Menge an Trockensubstanz etwas ins Gewicht fallen kann. Ein Lösen in Säure erschien aber bedenklich wegen der Veränderungen, die dadurch an den Bakterien eintreten könnten.

die gelben fielen stark ab. Die Oxalsäurezersetzer vermögen also besonders gut heterocyclische C-N-Verbindungen anzugreifen. In der Tabelle ist unten noch jeweils der Institutsstamm angegeben, der auf die betreffende Verbindung nach v. PLOTTHO besonders eingestellt sein soll. Man sieht, daß die Oxalsäurezersetzer durchweg an deren Leistung herankommen.

Tabelle 6. Verwertung heterocyclischer C-N-Verbindungen durch Oxalsäurezersetzer.

Stamm-Nr.	Pyridin	Piperidin	Nikotin	Anilin	Petroleum
38 (gelb)	—	+—	+—	+—	—
40 (rot)	++	+	+	+—	+
26 (rot)	+—	+	+	+—	+
6 (rot)	++	+	+	++	++
16 (blau)	++	++	++	+	+
36 (weiß)	++	++	++	++	++
33 (weiß)	+++	+++	++	++	++
9 (weiß)	+++	++	++	++	++
34 (rosa)	+++	+++	++	++	+++
Instituts- stämme	++++ <i>Pr. ruber</i>	+++ <i>Pr. ruber</i>	++ <i>Pr. citreus</i>	++ <i>Pr. ruber</i>	+ <i>Mycobact. luteum</i>

— = kein Wachstum

+— = sehr schwaches Wachstum

+ bis +++ = mäßiges bis sehr starkes Wachstum

### Kohlensäurebilanz der Oxalsäurezersetzung.

Tab. 7 zeigt die Kohlensäurebilanz bei dem Abbau des Oxalats (Mittelwerte aus 2—4 Parallelen) nach verschieden langer Kulturdauer. Es geht daraus klar hervor, daß mit dem Abbau der Oxalsäure die

Tabelle 7. Kohlensäurebilanz der Oxalsäurezersetzung.

Zeit	Ausgeschiedene CO <sub>2</sub> mg	Verbrauchtes Oxalat, mg, gefunden	Verbrauchtes Oxalat, mg, aus CO <sub>2</sub> berechnet	
4 Std	—	25,57	—	
1 Tag	8,0	53,44	12,2	Differenz gegen vorige Spalte rund 47 mg
2 Tage	28,8	91,27	43,8	
3 „	54,8	139,0	83,3	
4 „	89,5	188,2	136,0	
6 „	116,3	215,4	176,8	
7 „	152,5	239,9	231,8	

25 cm<sup>3</sup> Na-Oxalatnährlösung in 100er Kölbchen. 0,5% Nitrat.

Kohlensäureentwicklung vollkommen parallel geht und zum Schluß fast quantitativ ist. Daß nach 7 Tagen bei einigen Parallelen sogar 100% des Oxalats als CO<sub>2</sub> erschien (in der Tabelle im Mittelwert mit enthalten),

muß mit kleinen Versuchsfehlern zusammenhängen, da ja ein kleiner Teil des Oxalats als Mikroorganismensubstanz festgelegt ist. Das ändert aber nichts an der Tatsache des quantitativen Umsatzes.

Als Differenz der letzten gegen die vorletzte Spalte ergibt sich im Mittel rund 47,0 mg verbrauchtes Oxalat, das nicht als Kohlensäure erscheint. Das entspricht rund 13 mg C und, unter der Annahme von 40% C in der Mikroorganismen-trockenmasse, einem Trockengewicht von 32,5 mg. Da aber bei diesem Versuch maximal nur rund 11,3 mg Trockensubstanz im Höchstfalle gefunden wurden, so würde die Differenz auf ein Zwischenprodukt hinweisen. Nähere Untersuchungen darüber wurden nicht angestellt.

### Oxalsäurezersetzung durch andere Mikroorganismen.

3 Institutsstämme, *Proactinomyces ruber*, *citreus*, *flavus*, zeigten in Oxalsäure-nährlösung Entwicklung; sie war am besten bei *Pr. citreus*, zu dessen Gruppe ja auch die isolierten Oxalsäurezer-setzer gestellt wurden.

*Mycobacterium testudinis*, *luteum*, *lacticola*, *phlei*, *siliaceum*, *eos* (Stamm 18) und 13 verschiedene Stämme von *Actinomyces* entwickelten sich auf Oxalsäure-nährlösung nicht.

*Bacterium coli*, *Pseudomonas fluorescens* und *pyocyaneus* entwickelten sich darin ebenfalls nicht. Hinsichtlich *Ps. fluorescens* widerspricht das den Angaben von BRAUN u. CAHN-BRONNER (vgl. auch SCHOLDER u. LINSTRÖM).

Endlich interessierte, ob *Schimmelpilze*, die ja zum Teil kräftig Oxalsäure bilden und diese auch, wie aus alten Angaben von WEHMER (weitere positive Angaben bei BECHAMP, HAMADA, CHRZASZC) hervorgeht, später wieder verbrauchen, sich mit Oxalat als einziger Kohlenstoffquelle von der Spore aus entwickeln können. Weder von *Aspergillus niger* (Stamm Edendorf; bei pH 2,9, 4,0, 5,9, 7,0) noch bei einem aus Erde isolierten *Penicillium* wurde Oxalat zersetzt; es kam nur zu einem kümmerlichen Auskeimen. Die Entwicklung war bei Zusatz von Pepton etwas besser, aber auch dann trat keine Oxalatzersetzung ein.

Anders verhielten sich fertige Pilzdecken. Zwar konnte mit *Aspergillus niger*, Stamm Prag, einem kräftigen Oxalsäurebildner, kein Oxalsäureverbrauch festgestellt werden, jedoch mit *Aspergillus oryzae* unter Umständen ein 100%iger Verbrauch. Auch dieser Pilz vermochte jedoch nicht, auf Oxalatnährlösung anzuwachsen. Wenn diese wenigen Versuche auch nichts über die Eigenschaften aller Arten und Stämme aussagen können, so geht doch soviel daraus hervor, daß die Fähigkeit zur Verwertung der Oxalsäure bei Schimmelpilzen, insbesondere *Aspergillus niger*, nicht so ausgeprägt ist, daß sie allgemein als typische Oxalsäurezer-setzer betrachtet werden dürften.

Nachtrag bei der Korrektur: Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit erhielt ich Kenntnis von der Veröffentlichung J. V. BHAT und H. A. BARKER (J. Bacteriology 55, 359, 1948). Es wird dort die neue Art *Vibrio oxaliticus* (aus Bodenproben isoliert) beschrieben als typischer Oxalsäurezer-setzer. Von meinen Organismen unterscheidet sich dieses Bakterium physiologisch unter anderem stark dadurch, daß es nur in verdünnten Oxalat-Lösungen zu wachsen vermag (bis 0,4% Na-Oxalat), ferner dadurch, daß es Brenztraubensäure verarbeiten kann. Daß wir nicht den gleichen Organismus auffanden, liegt wohl daran, daß ich die Anreicherungskulturen mit stärkerer Oxalatlösung (1% gegenüber 0,1% bei den oben genannten Autoren) gewann.



### Zusammenfassung und Rückblick.

Aus den verschiedenartigsten Böden, Wasser und Schafpansen konnten oxalsäurezersetzende Mikroorganismen isoliert werden, die zur Gruppe des *Proactinomyces citreus* zu stellen sind. Sie zersetzen quantitativ oxalsaure Salze (als einzige Kohlenstoffquelle) bei aeroben Bedingungen unter Bildung von Kohlensäure. Im Vergleich zu Zucker ist die ökonomische Ausnützung etwa proportional dem kalorischen Wert der Kohlenstoffquelle.

Häufig finden sich schwer zu beseitigende gefärbte Begleitbakterien, unter denen eine rot wachsende Form wahrscheinlich identisch ist mit BASSALIKS *Bacillus extorquens*; sie hat jedoch nicht die Fähigkeit zur Oxalsäurezersetzung.

*Schimmelpilze* vermögen jedenfalls nicht allgemein, mit Oxalsäure als einziger Kohlenstoffquelle, anzuwachsen; doch bauen fertige Pilzdecken unter Umständen Oxalsäure ab.

Mit der Fähigkeit zur Oxalsäurezersetzung hat sich für *Proactinomycceten* eine weitere Eigenschaft ergeben, die ebenso wie der Abbau heterocyclischer Kohlenstoff-Stickstoffverbindungen (HORVATH, VON PLOTHO) und von humusartigen Stoffen (KÜSTER) charakteristisch ist für diese Mikroorganismengruppe resistenten oder giftigen organischen Stoffen gegenüber. Damit ist ein weiterer Hinweis dafür gegeben, daß die *Proactinomycceten* ein wesentlicher Bestandteil der autochthonen Mikroflora des Bodens sind, wie diesbezügliche Versuche von HOPF ergeben hatten.

### Literatur.

- BASSALIK, K.: Jahrb. wiss. Botan. **53**, 255 (1913). — BÉCHAMP: C. R. Paris 1870/71, S. 59. — BEIJERINCK, M. W.: Cbl. Bakt. II. **7**, 33 (1901); Folia Mikrobiol. **2**, 185 (1913). — BRAUN, H., u. C. E. CAHN-BRONNER: Cbl. Bakt. I. Orig. **86**, 1, 196 (1921). — BROCKMANN, H., u. H. PINI: Naturwissenschaften **34**, 190 (1947) (vgl. ferner DIETZEL, E.: Naturwissenschaften **35**, 345 (1948)). — CHRZASZC, T., u. D. TIUKOW: Biochem. Z. **218**, 73 (1930). — FISCHER, W.: Arch. f. Mikrobiol. **14**, 353 (1949). — GRAY, P. H. H., u. H. G. THORNTON: Cbl. Bakt. II. **73**, 74 (1928). — HAMADA, M.: Japan. J. Botan. **10**, 387 (1940). — HANNE, R.: Cbl. Bakt. I. Orig. **122**, 328 (1931). — HOPF M.: Arch. f. Mikrobiol. **14**, 661 (1949). — v. HORVATH, J.: Arch. f. Mikrobiol. **13**, 373 (1944). — JENSEN, H. L.: Proc. Linn. Soc. N. S. W. **56**, 79, 345 (1931); **57**, 364 (1932); **59**, 101 (1934). — KRASSILNIKOV, N. A.: Bull. Acad. Sci. USSR. Ser. Biol. **1**, 139 (1938). — KÜSTER, E.: Arch. f. Mikrobiol. **15**, 1 (1950). — LOMINSKI, I.: Cbl. Bakt. I. Orig. **128**, 276 (1933). — NORD, F. F., u. R. WEIDENHAGEN: Handbuch der Enzymologie. Akadem. Verlagsges. Leipzig 1940. — v. PLOTHO, O.: Arch. f. Mikrobiol. **13**, 93 (1942); **14**, 12 (1944). — SCHOLDER, R., u. C. F. LINSTRÖM: Ber. Dtsch. Chem. Ges. **63**, 2730 (1930). — SÖHNGEN, N. L.: Cbl. Bakt. II. **37**, 593 (1913). — WEHMER, C.: Botan. Zeitg. **49**, 233 (1891); Ber. Dtsch. Botan. Ges. **9**, 163 (1891).

(Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn.)

## Eine mikrobiologische Methode zum Nachweis von Samen- und Wurzelausscheidungen.

Von  
BERND STILLE.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 3. Juni 1949.)

Durch Untersuchungen von GASSNER und Mitarbeitern ist bekannt, daß keimende Samen organische Substanzen — insbesondere lösliche N-Verbindungen — in das umgebende Keimbett ausscheiden. Auch die neueren Arbeiten über die Rhizosphäre führten zu der Annahme, daß junge intakte Wurzelhärcchen aktiv Stoffe absondern, die in extrem nährstoffarmem Milieu überhaupt erst die Ausbildung einer Mikroflora der Rhizosphäre ermöglichen (STILLE, TIMONIN). Da es sich bei diesen Exkretstoffen durchweg um kleinste Mengen und meist nur um schwächste Konzentrationen handelt, ist ihr Nachweis mit Hilfe chemischer Methoden nicht nur schwierig, sondern dürfte in vielen Fällen auf diese Weise mit den uns bis heute zur Verfügung stehenden Mitteln kaum zu erbringen sein.

Die Entwicklung und die Wachstumsstärke von Mikroorganismen zeigen eine deutliche Beziehung zu der Menge der ihnen dargebotenen lebenswichtigen Nähr- und Wirkstoffe. Auf diese Tatsache gründen sich denn auch die NIKLASSche *Aspergillus niger*-Methode (NIKLAS) zur Ermittlung des Gehaltes der Böden an leicht aufnehmbaren Pflanzennährstoffen und der von SCHOPFER entwickelte Test auf Vitamin B<sub>1</sub> durch *Phycomyces Blakesleeanus* und die zahlreichen Tests auf sonstige Wirkstoffe mit den verschiedensten Mikroorganismen.

Im Rahmen einer laufenden Untersuchung, die sich mit der Stoffausscheidung keimender Samen verschiedener Pflanzenarten und der Mikroflora des Keimbettes beschäftigt, ergab sich die Notwendigkeit, kleinste Mengen derartiger Substanzen, und zwar möglichst unverdünnt, an Ort und Stelle nachzuweisen. Dabei zeigte sich ein Verfahren als besonders brauchbar, das wegen seiner einfachen Handhabung und insbesondere, da es sich leicht von Fall zu Fall sinngemäß modifizieren läßt, auch für die Ermittlung von Exkretstoffen von Wurzelteilen, Rhizoiden und Pilzhypen geeignet erscheint.

Um störende Einflüsse durch unerwünschte Infektionen zu vermeiden, erfolgt der gesamte Arbeitsgang unter Einhaltung steriler Bedingungen. Aus wiederholt mit Aqua bidestillata gewässertem Agar wird eine 2%ige Gallerte ohne Nährstoffzusatz gekocht, von der bestimmte

Mengen in Petrischalen zum Erstarren gebracht werden. Mittels eines Korkbohrers geeigneter Größe stanzt man alsdann Scheiben gewünschten Umfanges daraus und überträgt sie mit Hilfe eines Skalpell auf saubere Objektträger, die in Petrischalen gelegt werden. Eine wasserbenetzte Scheibe Filtrierpapier auf dem Boden jeder Petrischale sorgt für ausreichende Luftfeuchtigkeit innerhalb dieser Versuchskammern. Dann legt man die zu untersuchenden keimfreien Objekte, deren Ausscheidungen nachgewiesen werden sollen, auf die Agarscheiben und entfernt sie im einzelnen wieder nach verschiedenen Zeitabständen. Anschließend

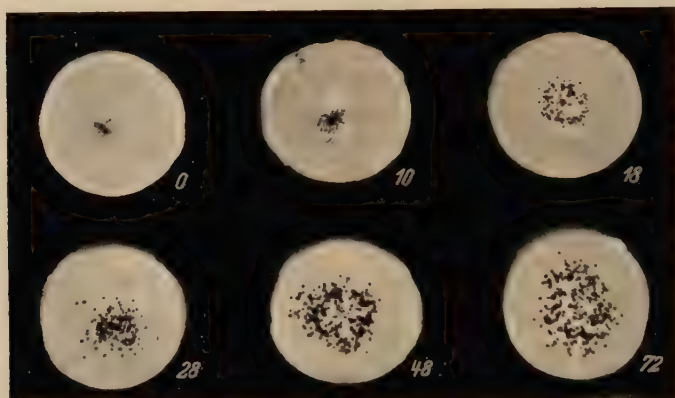


Abb. 1. Nachweis der von Weizenkaryopsen während der Keimung ausgeschiedenen Substanzen durch *Aspergillus niger*. Die Zahlen geben die Dauer des Verweilens der Samen auf den Agarscheiben in Stunden an. 1,5 natürlicher Größe.

werden die Agarscheiben mit der Reinkultur eines geeigneten Testorganismus, dessen Nährstoffansprüche bekannt sind, beimpft, um aus seiner Entwicklungsstärke Anhaltspunkte über den Umfang der von dem Versuchsobjekt ausgeschiedenen Substanzen zu gewinnen.

Feinere, annähernd quantitative Einblicke werden ermöglicht durch Anlage breiterer Serienversuche. Sie werden ebenfalls mit Agarscheiben gleicher Größe durchgeführt, die alle für den Testorganismus erforderlichen Nährstoffe in ausreichender Menge enthalten mit Ausnahme des jeweils zu prüfenden, der in abgestuften Konzentrationen zugesetzt wird und der im Grenzfall vollkommen fehlen muß. Das Volumen der Agarscheiben ist durch Wägung oder rechnerisch ( $\text{Vol.} = r^2 \cdot \pi \cdot h$ ) leicht zu ermitteln. Nun teilt man die gesamte Versuchsreihe in der Weise, daß man auf die eine Serie der Agarscheiben die Objekte bringt, deren Stoffausscheidung ermittelt werden soll, während die andere Serie davon unberührt bleibt. Schließlich werden beide Serien mit dem gleichen Testorganismus beimpft. Vergleicht man nun Umfang und Stärke der Ausbreitung, die der Organismus endlich auf den verschiedenen Agar-

scheiben erreicht, so ergibt sich ein Einblick in Art und Menge der von dem Versuchsobjekt ausgeschiedenen Substanzen.

Bei sorgfältiger Arbeitsweise lassen sich Infektionen durch andere Mikroorganismen weitgehend vermeiden. Auch die geringe Größe der Agarscheiben erweist sich in dieser Hinsicht als vorteilhaft; denn ihre Oberfläche ist etwa 30—50mal kleiner als die einer Petrischale, und hierdurch wird die Gefahr, daß während des Arbeitens Infektionen durch Keime von der Luft aus erfolgen, wesentlich eingeschränkt.

Als Beispiel zeigt die Abbildung den Nachweis von Substanzen, die von Weizenkaryopsen im Verlaufe der Keimung in ihre Umgebung ausgeschieden wurden. In dem vorliegenden Versuch wurden die Weizenkörner zunächst 20 min lang in 0,2%iger Bromlösung gebeizt, anschließend in steriler Aqua destillata gewässert und dann je ein Korn auf nährstofffreie Agarscheiben übertragen. Von Zeit zu Zeit wurde den Samen mittels einer Platinöse ein Tröpfchen steriles Wasser aufgetupft, um einen normalen Quellungsverlauf zu gewährleisten. Nach verschieden langem Verweilen (0—72 Std) wurden die einzelnen Körner wieder von den Unterlagen entfernt und alsdann die Agarscheiben mit Sporen von *Aspergillus niger*, der in diesem Falle als Testorganismus diente, beimpft.

Umfang und Stärke der Pilzentwicklung gestatten einen Einblick in die Menge der von den Samen während der Keimung ausgeschiedenen Substanzen. Diese Stoffe entstammen nicht dem toten Gewebe des Perikarps, da die Versuchsobjekte vor dem Auflegen auf die Agarscheiben gründlich gewässert waren, sondern dem Inneren der Samen. Es läßt sich ersehen, daß die Stoffabgabe im wesentlichen erst dann einsetzt, wenn das Quellungsmaximum der Samen erreicht ist, also in der Zeit zwischen 10 und 18 Std; ferner läßt die zunehmende Entwicklung des Pilzes auf den einzelnen Agarscheiben darauf schließen, daß nach diesem Zeitpunkt eine ziemlich konstante Stoffausscheidung der Samen einsetzt.

### Literatur.

- GASSNER, G., u. W. FRANKE: Z. f. Bot. **28**, 446 (1935). — KLEIN, G., u. J. KISSER: Die sterile Kultur der höheren Pflanzen. G. Fischer, Jena, 1924. — NIKLAS, H., H. POSCHENRIEDER u. J. TRISCHLER: Ernährung d. Pflanze **26**, 97 (1930). — NIKLAS, H., u. G. VILSMEIER: Biedermanns Zentralbl. **4**, 1 (1933). — SCHOPFER, W. H.: Erg. Biol. **16**, 1 (1939). — STILLE, B.: Arch. f. Mikrobiol. **9**, 477 (1938). — TIMONIN, M. J.: Soil Science **52**, 395 (1941).



(Aus dem Max Planck-Institut für Züchtungsforschung, Voldagsen.)

## Mutationsauslösung bei *Bacterium prodigiosum* durch sichtbares Licht nach Vitalfärbung mit Erythrosin.

(Erbmodus der Mutanten, Abhängigkeit der Mutabilität von Lichtdosis,  
Farbstoffkonzentration, Temperatur und Dauer der Anfärbung.)

Von

REINHARD W. KAPLAN.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. Juni 1949.)

In 1945 begonnenen Arbeiten wurde die Zeit- und Temperaturabhängigkeit der spontanen Mutabilität in ruhenden Zellen von *Bacterium prodigiosum* (KAPLAN 1947, 1949) und weiterhin die durch Ultraviolett ausgelöste Mutabilität (KAPLAN 1948) untersucht. Diese biophysikalischen Analysen der Erbvariationen dieses Bakteriums offenbarten eine weitgehende Ähnlichkeit mit den entsprechenden Mutationsprozessen bei höheren Organismen und führten zu der Annahme genähnlicher Erbinheiten auch in der Bakterienzelle, welche als „Bakteriengene“ den „Chromosomengenen“ höherer Organismen gegenübergestellt wurden. Wie in der letzten Zeit bekannt wurde, stellte ein amerikanischer Forscherkreis schon gegen Ende des Krieges Untersuchungen mit ähnlicher Zielsetzung besonders an *Bacterium coli* an, wobei gleichfalls die Analogie des bakteriellen Erbänderungsvorgangs mit dem Gen-Mutationsvorgang als wesentlichstes Resultat gewonnen wurde (Zusammenfassung bei LURIA 1947). Da durch diese beiden unabhängigen Untersuchungsgruppen ein Anschluß der Bakteriengenetik an die Genetik der höheren Organismen gewonnen war, erschien es aussichtsreich, Probleme der Mutationsforschung in Angriff zu nehmen, für deren Lösung der einfache Bau und die sonstigen Eigenarten der Bakterien eventuell eine günstigere Chance boten als die sonst zu Mutationsexperimenten verwendeten höheren Organismen.

Schon die Einwirkung der leicht absorbierbaren UV-Strahlen zeitigte bei den kleinen und daher leicht zu durchstrahlenden Bakterien übersichtlichere Verhältnisse als bei den meisten „höheren“ Objekten. Die obere Grenze wirksamer Wellenlängen im UV-Gebiet wurde bei etwa 300 m $\mu$  gefunden (KAPLAN 1948). Die Experimente über die Temperatur- und Zeitabhängigkeit der spontanen Mutabilität von *Drosophila* (TIMOFEEFF-RESSOVSKY und ZIMMER 1941) sowie von *Bacterium prodigiosum* (KAPLAN 1947) hatten Aktivierungsenergien von etwa 0,5—1,35 eV für verschiedene, als monomolekulare Reaktionen aufzufassende Mutationsschritte angezeigt. Es müßten daher auch energieärmere Lichtquanten bis mindestens 900 m $\mu$  Wellenlänge mutationsauslösend sein. Voraussetzung ist allerdings, daß die mutationsfähigen Zellstrukturen diese Strahlen absorbieren. Da dies nicht der Fall zu sein scheint, versuchte schon DÖRING (1938) eine „Photo-

sensibilisierung der Gene“ durch Vitalfärbung mit Eosin bei *Neurospora*. Dabei fand er zwischen verdunkelten und Tageslichtkulturen tatsächlich Unterschiede, die eine Änderung der Mutationsraten in diesem Sinne als sehr wahrscheinlich erscheinen lassen. Eine weitere biophysikalische Analyse unterblieb jedoch.

Ausgehend von diesen Überlegungen wurden nun bei *Bacterium prodigiosum* eingehendere Versuche unternommen. Sie sollten eine Klärung des biophysikalischen Mechanismus der photodynamischen Mutabilität dieses Organismus, welche in Vorversuchen gefunden worden war (KAPLAN 1948), bringen. Dabei wurde eine treffertheoretische Analyse des mutativen Auslösungsvorgangs in den Vordergrund gestellt, wie sie sich schon bei der Aufklärung der spontanen und UV-Mutabilität des Bakteriums sowie bei den genetisch überprüften höheren Organismen bewährt hatte. Kann doch durch die bisherige Mutationsforschung als gesichert angesehen werden, daß der Genmutationsvorgang einen mikrophysikalischen Akt (z. B. Quantensprung) innerhalb desjenigen submikroskopischen Bereichs der Vererbungssubstanz, also vor allem des Chromosoms, darstellt, der als „Gen“ bezeichnet wird.

In den vorliegenden Versuchen, über die zum Teil schon kurze Vorberichte (KAPLAN 1948, 1949) gegeben wurden, war nicht nur die Auslösung von Mutationen beachtet worden, sondern auch die Abtötung der Zellen. Die Letalwirkung der ultravioletten sowie auch ionisierenden Strahlen auf die Bakterien hat ja viele Ähnlichkeiten mit dem Genmutationsvorgang und ist daher von einigen Seiten als etwas diesem Ähnliches angesehen worden. Die in den vorliegenden Lichtversuchen gefundenen Unterschiede zwischen Mutation und Tötung scheinen für die Beurteilung jener Interpretation von Bedeutung zu sein.

In den früheren Experimenten war die erbliche Natur der strahleninduzierten Zwergwuchskolonien nur vorläufig orientierend untersucht worden, da ja zuvorderst ihr Entstehungsmechanismus interessierte und erst in zweiter Linie die Übertragungsweise des geänderten Erbcharakters auf die Nachkommen. Diesmal wurde nicht nur die Erbllichkeit des Zwergcharakters überhaupt geprüft, sondern die Eigenart der Nachkulturkolonien auch quantitativ erfaßt. Dabei fand sich ein anscheinend besonderer Vererbungsmodus, der vielleicht gewisse Beziehungen zur „plasmatischen“ Vererbung haben könnte und daher der eingehenderen zukünftigen Analyse wert zu sein scheint. Erste Ergebnisse werden darüber im folgenden mitgeteilt.

## I. Allgemeine Methodik.

Der in den Versuchen verwendete Stamm von *Bacterium prodigiosum* (*Serratia marcescens*) war der gleiche wie in den früheren Versuchen<sup>1</sup>. Als Nährboden diente wie bisher der Glycerin-Citrat-Ammonphosphat-Agar (KAPLAN 1948).

<sup>1</sup> Herrn Professor RIPPEL (Göttingen) sei auch an dieser Stelle für die Freundlichkeit der Überlassung dieses Stammes gedankt.

Die Bestrahlung mit sichtbarem Licht erfolgte nicht wie bisher mit einer Bogenlampe, sondern der größeren Bequemlichkeit und Intensitätskonstanz halber mit einer Osram-Punktlicht-Glühlampe 6 Volt 5 Amp. in einer Zeiß-Mikroskopierlampe. Die Glühspirale der Lampe wurde durch die im Lampengehäuse angebrachte, die Wärmestrahlen absorbierende Parabellinse in die Suspension hineinprojiziert. Zur weiteren Absorption der Infrarot-Strahlen passierte das Licht das Wärmefilter aus Spezialglas von einem Leitz-Kleinfilmprojektor. Dieses unter  $45^\circ$  im Strahlengang stehende Glasfilter reflektierte einen Teil der Strahlen rechtwinklig zur Seite auf ein Elektrozell-Sperrschicht-Photoelement. Dieses trug eine Schwarzpapier-Blende mit kreisrundem Ausschnitt von 24 mm Durchmesser, welcher demjenigen des Glastubus entsprach, der die zu bestrahlende Suspension enthielt. Auf diese Weise war die Kontrolle und Konstanthaltung der Intensität während der Bestrahlung möglich. Die Intensität wurde durch die Irisblende der Mikroskopierlampe reguliert. Während der Bestrahlung wurde die Suspension von einem Wechselstrom-Summer, der eine zurechtgebogene Drahtspirale als Rührer trug, gerührt. Dadurch wurde eine gleichmäßige Verteilung der inhomogen einfallenden Strahlung auf alle Zellen der Suspension erreicht. Das an ein empfindliches Galvanometer angeschlossene Photoelement war bei homogen einfallender Strahlung mit einem Spezial-Vakuum-Thermoelement nach HASE, welches nach einer Hefnerkerze absolut geeicht worden war, verglichen worden. Ein Teilstrichausschlag am Galvanometer des Photoelements entsprach einer Intensität von  $4,3 \cdot 10^5 \text{ erg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ , so daß die in den Versuchen angegebene Dosiseinheit  $E = 4,3 \cdot 10^5 \text{ erg cm}^{-2}$  beträgt.

Die zu bestrahlende Zellsuspension wurde durch Einrühren einer Impfmasse aus einer Einzelkolonie einer 2—3tägigen Plattenkultur in meist 5 oder 10  $\text{cm}^3$  Farbstofflösung in Leitungswasser gewonnen. Die Zellen befanden sich also in der Ruhephase. Als sensibilisierender Farbstoff diente Erythrosin pur. (Dr. G. GRÜBLER, Leipzig). Zur Ausschaltung des Tageslichtes waren die Suspensionsröhrchen mit Manschetten aus schwarzem Papier versehen. Die Suspension wurde dann für einige Stunden zwecks ausreichender Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen bei konstanter Temperatur (meist  $20^\circ \text{C}$ ) im Dunkelthermostat bis zur Bestrahlung aufbewahrt. Diese dauerte gewöhnlich nur einige Minuten. Nach den einzelnen Dosen entsprechenden Bestrahlungszeiten wurden innerhalb kurzer Pausen Proben von 0,5  $\text{cm}^3$  Suspension entnommen und mittels 0,5- $\text{cm}^3$ -Pipetten und Reagenzröhrchen mit 5  $\text{cm}^3$  Leitungswasser Verdünnungsstufen in Zehnerpotenzen hergestellt. Von den zu untersuchenden Verdünnungen wurde je ein Tropfen auf eine vorbereitete Agarplatte ausgespatelt, wobei die Pipette festgespannt war, um die Tropfengröße konstant zu halten. Sofort nach Beimpfung kamen die Platten zur Bebrütung in den Dunkelthermostaten von  $30^\circ \text{C}$ . Selbstverständlich wurden beim Arbeiten die Regeln der Sterilhaltung beachtet. Um den Einfluß des Tageslichtes auf ein unwesentliches Maß herabzudrücken, wurden die einzelnen Manipulationen möglichst schnell und bei gedämpftem Licht ausgeführt.

Nach 48 Std Bebrütung hatten die Kolonien wegen Erschöpfung des Nährbodens das Wachstum beendet, so daß die Auswertung der Platten erfolgen konnte. Außer der Gesamtzahl aufgewachsener Kolonien wurde die Anzahl veränderter gezählt. Wie schon früher (1948) beschrieben, bestehen die Auswirkungen der Mutationen zum allergrößten Teil in der Erzeugung von Zwergwuchs. In den vorliegenden Versuchen wurde daher meist nur die Rate der Zwergwuchsmutanten festgestellt, wodurch es möglich war, größere Versuchsumfänge zu bewältigen. Als gut unterscheidbarer Genotyp wurden auch zum Teil die früher beschriebenen (1947, 48) weißen Kolonien ausgezählt, die wegen der hohen spontanen Mutationsrate  $r \rightarrow w$  immer in einem  $\pm$  kleinen Prozentsatz vorhanden sind.



Zur Errechnung der angegebenen Fehlergrenzen diente die der Näherungsformel  $\sqrt{p(1-p)/n}$  zugrunde liegende graphische Tafel von KOLLER (1940).

## II. Ergebnisse und ihre Folgerungen.

### 1. Charakter der Mutanten.

Die Nachkommenschaften mutierter Zellen erscheinen auf den Zählplatten als Zwergkolonien von weniger als einem Drittel des Durchmessers der in ihrer Nachbarschaft liegenden Normalkolonien. Da eine scharfe Grenze zwischen Normalwuchs und Zwergwuchs wegen der Variationen in der Größe der Normalkolonien nicht zu ziehen ist, andererseits eine Bestimmung der absoluten Höhe einer Mutationsrate weder grundsätzlich möglich noch auch nötig ist, wurde die Grenze von einem Drittel des Normaldurchmessers  $\pm$  willkürlich festgelegt. Weil die Koloniegröße, wie schon früher (1948) ausgeführt, stark von der Bewuchsdichte der Platte sowie der Lage der Kolonien auf der Platte abhängt (Randkolonien sind immer größer), wurde der Zwergwuchs immer nur relativ zu den umgebenden Kolonien festgelegt. Auch wurden aus diesem Grunde nur Platten mit einer Koloniezahl von mehr als einigen hundert ausgewertet, da sich nur bei dieser Bewuchsdichte der Zwergwuchs aus weiter unten darzulegenden Gründen klar manifestiert. Die Abhängigkeit der Phänausprägung der Mutationen von Umweltbedingungen ist ja eine verbreitete Tatsache (KAPLAN 1943/48).

Die Prüfung der genetischen Natur des Zwergwachses der Mutantenkolonien geschah durch Aufzucht weiterer Plattenpassagen (Nachkulturen) aus den ursprünglichen Zwergkolonien. Wichen diese außer im Wuchs auch in der Färbung (oft heller, seltener dunkler rot) ab, so war an den Nachkulturen die Vererbung der Farbeigenschaften leicht festzustellen. Der Zwergwuchs dagegen war an den Nachkulturen meist nicht deutlich zu erkennen. Manche Mutantenstämme ergaben zwar etwas kleinere Durchmesser der ausgewachsenen Kolonien, besonders an dicht bewachsenen Stellen der Platte, wodurch eine größere durch Wuchsdichte bedingte Variabilität des Koloniedurchmessers als bei Normalen-Platten zustande kam. Oft aber war keinerlei Unterschied gegenüber dem Ausgangsstamm zu bemerken. Wurden von solchen scheinbar normalen Zwergnachkulturen Mischkulturen mit dem Ausgangsstamm aufgezogen, so äußerte sich die Erbllichkeit des Mutantencharakters in einer erhöhten *Varianz* der Koloniegröße über die ganze Platte hin. Es lag daher die Vermutung nahe, daß der Zwergwuchs sich nur manifestiert, wenn von den umgebenden Normal-Kolonien eine hemmende Wirkung ausgeht. Daß nicht einfach die unterschiedliche Endgröße der Kolonie von etwa dem Nährsubstrat durch die Normalen zugeführten oder entzogenen Stoffen abhängt, machten Versuche deutlich, bei denen die verschiedenen Stämme auf Nährboden kultiviert



wurden, der vorher durch das Wachstum des normalen Stammes „verbraucht“ worden war. Ein Unterschied zwischen der Größe ausgewachsener Kolonien von Zwerg- und Normalstämmen war auch auf diesem gebrauchten Medium nicht zu konstatieren. Demnach beruht also der Zwergwuchs nicht auf einer unterschiedlichen Größe der ausgewachsenen Kolonien an sich, sondern auf einer unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit. Die langsamer wachsenden Mutantenstämme erreichen nur inmitten ihrer normalwachsenden Nachbarn eine geringere Endgröße der Kolonien, wenn das Wachstum gleichzeitig mit den Normalen durch Erschöpfung des Nährbodens sistiert wird. In Reinkulturen erreichen sie dagegen wegen Wegfalls der Konkurrenz mit den Normalen im allgemeinen die gleiche Endgröße wie diese.

Tabelle 1. *Durchschnittsgrößen wachsender Mutantenkolonien.*

Erste Nachkultur nach 8 Tagen (23stündige Kolonien)			Zweite Nachkultur nach 6 bzw. 8 (*) Tagen (19stündige Kolonien)		
	$\mu \pm \sigma$	% von Normal		$\mu \pm \sigma$	% von Normal
Normal 1.	400 $\pm$ 5	100	Normal 3. . . . .	255 $\pm$ 5	100
„ 2.	383 $\pm$ 8		Zwerg 2. . . . .	208 $\pm$ 4	81
„ 3.	393 $\pm$ 5		„ 5. . . . .	194 $\pm$ 5	76
Zwerg 1.	302 $\pm$ 4	77	„ 6. . . . .	191 $\pm$ 3	75
„ 2.	267 $\pm$ 7	68	„ 10. große Kol. . .	267 $\pm$ 5	105
„ 3.	311 $\pm$ 5	79	„ 10. kleine Kol. . .	183 $\pm$ 3	72
„ 4.	307 $\pm$ 3	78	„ 10. beliebige * . .	170 $\pm$ 4	67
„ 5.	292 $\pm$ 5	74	„ 10. „ * . . . .	199 $\pm$ 6	78
„ 6.	272 $\pm$ 10	69	„ 10. „ * . . . .	182 $\pm$ 4	71
„ 7.	321 $\pm$ 6	82	„ 10. „ * . . . .	192 $\pm$ 4	75
„ 8.	342 $\pm$ 5	87	„ 10. „ * . . . .	194 $\pm$ 4	76
„ 9.	339 $\pm$ 7	86	„ 11. große Kol. . .	204 $\pm$ 5	80
„ 10.	400; 260	100; 66	„ 11. mittlere Kol. .	204 $\pm$ 3	80
„ 11.	490; 330; 210	125; 84; 54	„ 11. kleine Kol. . .	232 $\pm$ 3	91

Die unterschiedliche Wachsrates der Zwergstämme wurde nun in Messungen von Kolonien deutlich, die sich — etwa höchstens 24 Std nach der Impfung — noch im vollen Wachstum befanden, wenn dieses also durch benachbarte Kolonien noch unbeeinflusst ist. Die Tab. 1 führt das Ergebnis solcher Messungen auf und zeigt klar, daß der Durchmesser (in  $\mu$ ) wachsender Zwergmutantenkolonien wesentlich unterhalb dem des Normalstammes liegt. Auch die Erbllichkeit dieser verminderten Wachsrates geht aus den Ergebnissen der 2. Nachkulturen deutlich hervor.

Die Statistik der Koloniegröße wachsender Mutantenstämme zeitigte auch ein merkwürdiges Ergebnis: Während die Verteilungsfunktion für die Normalen sowie für die meisten Wuchsmutanten eingipflig war, war die Verteilung bei den ersten Nachkulturen zweier verschiedener Zwergkolonien deutlich mehrgipflig. Wie die Tab. 1 zeigt, lag bei Zwergkolonie 10.

der Hauptgipfel (Fettdruck) bei  $260\ \mu$ , ein zweiter kleinerer Gipfel bei  $400\ \mu$ , welcher letzterer der Größe des Normalstamms entspricht. Zwerg 11. ergab 3 Gipfel, der kleinste bei  $210\ \mu$ , der Hauptgipfel bei  $330\ \mu$  und ein mittelgroßer Gipfel bei dem übernormalen Wert von  $490\ \mu$ . Eine Entstehung dieser beiden Zwergkolonien etwa aus mehreren verklebten Zellen verschiedener genotypischer Wuchskonstitutionen dürfte nicht in Frage kommen, weil ja die schnellwüchsigen Zelltypen dann in wesentlich größerer Häufigkeit als diejenigen mit langsamerem Wuchs vorhanden sein müßten. Es muß daher die Verschiedenheit der Genotypen innerhalb der ursprünglichen Zwergkolonien während des Wachstums entstanden sein.

Naheliegend ist die Annahme von spontaner Weitermutation des strahleninduzierten Gens zu Allelen mit anderen Wuchsraten. Falls dies zuträfe, müßte sich dieses Weitermutieren, also die Labilität des Ausgangsgens, auch in der zweiten Nachkultur wieder offenbaren. Wie aber die 2. Nachkultur von Kolonien der ersten Nachkommenschaft des Zwerges 10. zeigt (Tab. 1), war eine solche Mehrgipfligkeit dort nicht mehr festzustellen. Die Nachkommenschaft einer großen, also wohl normalen Kolonie aus dem Zwerg 10. ergibt nur einen, dem Normaltyp ( $267\ \mu$ ) entsprechenden Gipfel, 6 andere Kolonien ebenfalls eingipflige Verteilungen mit zwergiger Durchschnittsgröße. Demnach sind die aus der Ausgangs-Zwergkolonie hervorgegangenen verschiedenen Genotypen wieder stabil geworden. Das gleiche gilt für die 2. Nachkultur des ursprünglich „dreigipfligen“ Zwerges 11., die auch keine Mehrgipfligkeit, also „Labilität“, erkennen lassen. Man könnte nach diesen Befunden annehmen, die „Weitermutation“ des Ausgangsalleles ginge so schnell vonstatten und hätte zu völlig stabilen Allelen geführt, daß größere Mengen „zweigipfliger“, d. h. labiler Kolonien, nicht gefunden worden sind. Die anscheinend statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Größen der 2. Nachkultur-Kolonien scheinen aber doch einen komplizierteren Vererbungsmechanismus anzudeuten, den wir von höheren Organismen her nicht gewöhnt sind.

Schon in den UV-Experimenten (KAPLAN 1948) waren in geringer Häufigkeit Kolonien beobachtet worden, die wegen ihres schlierenartig-unregelmäßig verteilten Farbstoffes als „Schlierenkolonien“ registriert wurden. In den vorliegenden Lichtexperimenten wurden sie wegen geringer Häufigkeit nicht berücksichtigt. Die Nachkulturen dieser Schlierenkolonien ergaben, wie früher geschildert, einen großen Anteil Normalfarbiger, einen anderen erheblichen Teil weißer Kolonien, z. T. mit roten Sektoren, jedoch nur einen geringen Prozentsatz Schlierenkolonien vom Elterntyp. Die 2. Nachkulturen der Normalroten sowie auch der weißen Kolonien verhielten sich wie die üblichen r- bzw. w-Stämme. 2. Nachkulturen der seltenen Schlierenkolonien wurden nicht vorgenommen.

Dieser damals schon als abweichend erkannte Mutantentyp, der aber aus äußeren Gründen noch nicht weiter untersucht worden war, gewinnt nun durch die oben geschilderten Befunde erneutes Interesse. Da wegen der Zunahme seiner Häufigkeit mit der Dosis in den UV-Experimenten eine Entstehung aus mehreren verklebten Zellen kaum in Frage kommt, muß wohl auch bei ihm an ein analoges „Abspalten“ stabiler Formen aus einer „labilen“ Ausgangsform gedacht werden, wie bei jenen Zwergkolonien. Daß dieser merkwürdige Vererbungsmodus bei Bakterien auch anderweitig gefunden worden zu sein scheint, legen die Berichte der amerikanischen Bakteriengenetiker über ein „verzögertes Auftreten“ strahlenausgelöster Mutanten nahe (DEMEREK 1946). Dort wurde beobachtet, daß die strahlenausgelösten Mutationen für Resistenz gegenüber Bakteriophagen nur z. T. direkt nach der Bestrahlung zu finden sind, ein erheblicher Teil an Resistenzmutanten aber erst manifest wird, nachdem mehrere Zellteilungen abgelaufen sind. Ob bei diesen „verzögerten“ Mutationen außer den resistenten Zellen auch noch andere, nicht resistente „abgespalten“ wurden (analog den Normaltypen der Schlieren- und Zwergkolonien), konnte mit der dort angewandten Methode nicht festgestellt werden. Auf jeden Fall waren aber die retardiert mutierten Mutterzellen und ihre ersten Nachfolgegenerationen phagenanfällig und es ist wahrscheinlich, daß nur einzelne der später entstandenen Nachkommenzellen den Charakter der Phagfestigkeit erhielten.

Dieser bei Bakterien beobachtete Vererbungsmodus, der wegen des verzögerten „Abspalten“ von Genotypen als „retardierte Genodispersion“ bezeichnet sei, scheint bei höheren Organismen noch nicht näher analysiert zu sein. Die anscheinende Ungeregeltheit des Herauspalten suggeriert die Vorstellung, daß die Verteilung der entsprechenden Erbinheiten bei der bakteriellen Zellteilung durch keinen so gut ordnenden Mechanismus geschieht, wie wir es von der Mitose der kernhaltigen Zellen her kennen. Schon von DEMEREK wurde die Möglichkeit ins Auge gefaßt, daß jene Retardierung auf eine mehr oder minder zufallsgemäße Entmischung von Erbinheiten im Verlaufe der ersten Zellgenerationen beruht. Das beim *Bacterium prodigiosum* gefundene, im Laufe des Koloniewachstums stattfindende Auftreten mehrerer stabiler Genotypen paßt mit dieser Entmischungshypothese gut zusammen. Das Verhältnis der einzelnen Genotypen in der Kolonie könnte durch das Verhältnis der mutierten zu den normalgebliebenen Erbinheiten (Genen) in der bestrahlten Mutterzelle sowie auch durch die individuellen Vermehrungsraten der Gen-Typen innerhalb der Zellen und natürlich die Zufälligkeiten der Gen-Verteilung auf die Nachkommen variiert werden. Es wäre möglich, daß die aus anscheinend nur einem Zelltyp bestehenden normalen („eingipfligen“) Zwergkolonien grundsätzlich durch den gleichen Entmischungsmechanismus zustande kommen, nur



daß hier wegen hoher Vermehrungsrate des mutierten Gen-Types das verzögerte Abspalten so schnell verläuft, daß nur sehr wenige und daher nicht nachweisbare Normalzellen bei der Koloniebildung auftreten. Diejenigen Mutationen, deren Entmischung wegen kleinerer Vermehrungsraten der mutierten Gene mit starker Verzögerung abläuft und die daher erhebliche Mengen Normalzellen „dispergieren“, wären ja mit der angewandten Methodik überhaupt nicht zu erkennen, da sie wegen des hohen Normalgehaltes normal große Kolonien ergäben.

Wie weit sich diese Arbeitshypothese, die mehr oder minder frei in der Bakterienzelle gelegene autosynthetische Erbeinheiten voraussetzt, mit den Ergebnissen von LEDERBERG (1948) verträgt, welche ja chromosomenhafte Genaggregate bei Bakterien anzuzeigen scheinen, sei wegen der Unsicherheit aller dieser Vorstellungen hier nicht weiter diskutiert. Von Bedeutung scheint aber für die Interpretation der retardierten Genodispersion die von MICHAELIS (1944) für die plasmatische Vererbung bei höheren Pflanzen entwickelte Vorstellung der Entmischung von Plasmonkomponenten im Verlaufe der Individualentwicklung zu sein. Es wäre möglich, daß wir in den mitgeteilten experimentellen Ergebnissen einer ersten Spur „plasmatischer Vererbung“ bei den Bakterien begegnet sind, während in LEDERBERGS Befunden sich die bakterielle Chromosomenvererbung entschleierte. Das braucht natürlich noch nicht die Aufteilung der Bakterienzelle in einen echten Kern und ein davon gesondertes Plasma zu bedeuten. Eine weitere Aufklärung des Vorganges muß von ausgedehnteren Nachkulturen erwartet werden.

Die im folgenden durchgeführte biophysikalische Analyse wird von diesen Befunden nicht wesentlich berührt, da in ihr ja der Vorgang der Entstehung der veränderten Erbfaktoren untersucht wird, während sich die obigen Darlegungen auf die vom Entstehungsakt unabhängige Weitergabe der mutierten Gene bezieht.

## *2. Dosisabhängigkeit der Mutantenauslösung.*

Die Ergebnisse der Dosisversuche sind in der Abb. 1 dargestellt. In 3 getrennten Versuchen, die bis auf etwas unterschiedliche Anfärbungsdauer in gleicher Weise angestellt wurden, ergab sich ein linearer Abfall des Überlebenden-Logarithmus, ähnlich wie es auch seinerzeit für das UV-Gebiet festgestellt wurde. „Tötung“ einer Zelle bedeutet in derartigen Bestrahlungsexperimenten natürlich nur: Verlust der Fähigkeit, eine wahrnehmbare Kolonie zu bilden, also vor allem der Vermehrungspotenz. Andere Lebensfunktionen, z. B. die Atmung, brauchen damit durchaus nicht unterbunden zu sein. In der Figur ist rechts die Skala für den Logarithmus der jeweils gefundenen Keimzahl pro Tropfen ( $\log N$ ) aufgetragen, die zugehörigen Kurvenpunkte sind als hohle Kreise oder Vierecke markiert.



Die Mutationsrate als Prozentsatz gezählter Zwergkolonien ist auf die linke Skala bezogen, die Kurvenpunkte als ausgefüllte Kreise bzw. Vierecke zusammen mit den einfachen mittleren Fehlern als senkrechte Linien eingetragen. Es ist ohne weiteres deutlich, daß dieser Mutantenprozentsatz nicht linear, sondern entsprechend einer nach oben konvexen Kurve von der Lichtdosis, die auf der Abszisse in Einheiten E

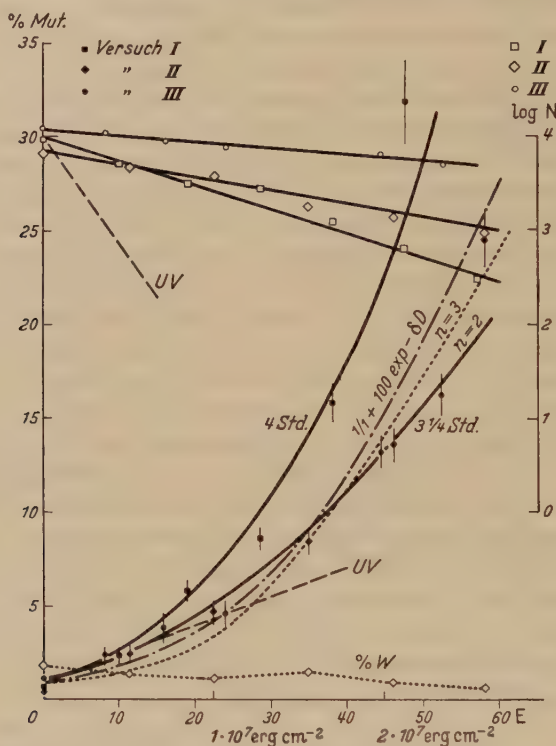


Abb. 1. *Bacterium prodigiosum*. Lichtdosis-Abhängigkeit Erythrosin 1:20000. Anfärbung bei 20°, 3 1/4 bzw. 4 Std. 10 cm<sup>3</sup> Suspension. Schichtdicke 24 mm.

und  $\text{erg} \cdot \text{cm}^{-2}$  abgetragen ist, abhängt. Die photodynamische „Tötung“ des Bakteriums stellt also ebenso wie diejenige durch UV oder ionisierende Strahlung einen Eintrefferprozeß dar, d. h. zu ihrer Auslösung genügt die Absorption eines einzigen Strahlenquantens im empfindlichen Bereich der Zelle.

Bei der Erhöhung der Mutantenrate mit der Dosis ist es zunächst nicht von vornherein sicher, ob überhaupt eine Auslösung von Mutationen durch das Licht stattgefunden hat, oder nur eine Selektion von Mutanten dadurch, daß diese weniger schnell abgetötet werden als die normalen Zellen. Wie schon früher dargelegt (KAPLAN 1947), folgt eine

so zustandekommende Dosisabhängigkeit der Mutantenrate  $m$  der Formel:  $m = 1/1 + A_0 \exp - \delta D$ , in der  $A_0$  das Ausgangsverhältnis von Normalen zu Mutanten,  $\delta$  die Differenz der Tötungsexponenten und  $D$  die Lichtdosis bedeutet. Als Tötungsfunktion ist bei der Ableitung der Formel die hier zutreffende Exponentialfunktion  $N = N_0 \exp - \tau D$  ( $N$  = Überlebendenzahl,  $N_0$  = Keimzahl am Anfang,  $\tau$  = Tötungsexponent) verwendet worden. Die obige Formel für  $m$  ergibt eine hyperbelähnlich nach oben gekrümmte Kurve.

Um die Möglichkeit des Zutreffens dieser Selektionshypothese zu prüfen, wurde die Funktion  $m = 1/1 + 100 \exp - x$  über die empirischen Punkte gezeichnet, wobei  $x = 0,064 \cdot D$  als bestdeckender Wert verwendet wurde. Die Differenz der Tötungsraten  $\tau_{\text{mut}} - \tau_{\text{norm}} = \delta$  beträgt dann also 0,064 Tote/Dosiseinheit E. Der im Experiment gefundene Tötungsexponent für die bestrahlte Suspension ist nun  $\tau = 2,30$  ( $\log N_0 - \log N)/D = 0,018$  Tote/E. Er ist also wesentlich kleiner, als der für das Zustandekommen jener „Selektionskurve“ notwendige Wert für  $\delta = 0,064$  Tote/E. Demnach ist es unmöglich, daß eine so stark ansteigende Selektionskurve bei der vorliegenden Gesamttötungsrate entstehen kann.

Das Nichtzutreffen der Selektionshypothese wird auch durch folgende kleine Rechnung gezeigt: Eine unbestrahlte Suspension enthielt  $1,3 \cdot 10^4$  Keime/Tropfen mit 1% Mutanten, also  $1,3 \cdot 10^2$  Zwergkeime. Nach einer Lichtdosis von 50 E waren nur noch  $5,5 \cdot 10^3$  Keime im Tropfen, der Mutantengehalt auf 16% gestiegen, was einer Absolutzahl von  $8,8 \cdot 10^2$  Mutantenkeime/Tropfen entspricht. Die Absolutzahl der Zwergkeime im Tropfen Suspension ist also durch die Belichtung von 1300 auf 8800 gestiegen; eine Zunahme der Absolutzahl kann aber durch unterschiedliches Ausmerzen niemals zustandekommen. Demnach müssen diese Zwergzellen durch die Belichtung entstanden sein.

Diese Überlegungen über die Möglichkeit der Veränderung der Mutantenrate durch unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit des Normal- und Mutantentyps zusammen mit experimentellen Befunden gaben Anlaß, nochmals das Verhalten der beiden spontan mutativ ineinander übergehenden Phänotypen  $r$  und  $w$  (KAPLAN 1947) zu untersuchen. In den Bestrahlungsversuchen wurden immer Zellen einer roten ( $r$ ) Kolonie verwendet. Wegen der hohen spontanen Mutabilität  $r \rightarrow w$  war aber immer auch ein geringer Prozentsatz  $w$ -Zellen in der Ausgangssuspension anwesend, die sich durch weiße Farbe der daraus erwachsenden Kolonien zu erkennen gaben. Die früheren UV-Versuche (1948) hatten eine gesicherte Veränderung der  $w$ -Rate durch die Bestrahlung nicht ergeben. Damit war eine Entstehung des  $w$ -Typs durch Mutationsauslösung nicht nachzuweisen gewesen, was mit der wohl sehr geringen

Treffwahrscheinlichkeit für ein Einzelgen (worum es sich im Falle des *w*-Typs wohl handelt) erklärt wurde.

Das Unterbleiben des *w*-Raten-Anstiegs hätte seine Ursache auch in einem etwas größeren Tötungsexponenten der *w*-Zellen haben können, der zum Absinken des *w*-Anteils mit der Dosis führen und so eine geringe Auslösung an *w*-Mutationen überdecken würde. Die im UV-Versuch III (1948) gefundene Folge von *w*-Prozentsätzen läßt diese Annahme zu. Ein Abfall des *w*-Prozentsatzes mit der Dosis wurde aber wahrscheinlich durch die hier mitgeteilten Lichtversuche. Besonders Lichtversuch III, dessen Ausgangs-*w*-Rate wegen Verwendung einer etwas älteren *r*-Kolonie  $6,28 \pm 0,67\%$  betrug, zeigte nach einer Lichtdosis von 53 E nur noch  $3,28 \pm 0,48\%$  *w*-Kolonien in der Zählplatte, ein Unterschied, der als statistisch gesichert angesehen werden darf ( $\text{Diff}/m_{\text{Diff}} = 3,75$ ,  $P = 0,02\%$ ). Auch die eingezeichnete Punktfolge ( $\%$  *w* Abb. 1) des Versuchs II läßt einen Abfall erkennen.

Zur Erhärtung des so angezeigten wahrscheinlichen Unterschiedes in der Strahlenempfindlichkeit der *w*- und *r*-Zellen wurde in einem besonderen Versuch die UV- sowie die photodynamische Tötung zweier Zellsuspensionen verglichen, von denen die eine aus einer *r*-Kolonie stammte und 0,9% *w*-Zellen enthielt, die andere aus einer *w*-Kolonie mit 39% *r*-Zellen. Die UV-Bestrahlung ergab einen Tötungsexponenten für die *r*-Suspension  $\tau_r$  (UV) = 0,063 pro UV-Einheit, für die *w*-Suspension  $\tau_w$  (UV) = 0,101. Diese Suspension war also 1,6 mal UV-empfindlicher als jene. Die Lichtbestrahlung (nach Anfärbung mit Erythrosin 1:40000 5 Std bei 20°C) ergab  $\tau_r$  (Licht) = 0,076 und  $\tau_w$  (Licht) = 0,176. Hier war also das Verhältnis  $\tau_w:\tau_r = 2,3$ . Ob die größere Empfindlichkeit der *w*-Zellen gegen Licht im Vergleich zu UV auf größerer Farbstoffadsorption als bei den *r*-Zellen beruht, bleibt offen. Es sei noch angemerkt, daß die gefundenen Empfindlichkeitsverhältnisse niedriger sind, als die der reinen Typen, da ja in der *w*-Suspension über  $\frac{1}{3}$  *r*-Zellen vorhanden waren.

Die auf Grund des bisher bekannten Mechanismus der Mutationsauslösung in Frage kommende Deutungsmöglichkeit der gefundenen Kurvenform ist die quantenbiologische Treffertheorie. Bei höheren Organismen hat die treffertheoretische Auswertung der Erhöhungen der Mutationsrate durch ionisierende und ultraviolette Strahlung ergeben (TIMOFEEFF-RESSOVSKY 1937), daß die Mutationen eines Gens in der atomphysikalischen Umlagerung eines molekulartigen Gebildes bestehen, für die die Energie eines einzelnen Strahlenquantums ausreicht. Auch für Bakterien hat sich diese Entstehungsweise als zutreffend erwiesen (LINCOLN 1940, KAPLAN 1947, LURIA 1947). Während nun die lineare Zunahme der Mutationsrate mit der Dosis im Röntgengebiet und bei Ultraviolett anzeigt, daß zur Auslösung der betreffenden Mutationen

Jeweils nur ein einziges Energiequant ausreicht, also eine Eintrefferfunktion vorliegt, deutet die gefundene Kurve der photodynamischen Mutabilität bei *Bacterium prodigiosum* auf eine Mehrtrefferfunktion. Es muß also durch das Bakterium bzw. den in das Bakterium eingelagerten Farbstoff mehr als ein Lichtquant absorbiert werden, wenn eine Mutation statthaben soll. Die Krümmungsstärke der gefundenen Folge an Kurvenpunkten ist am besten durch die Zweitrefferefunktion wiederzugeben, wie es die eingezeichneten Kurven ( $n = 2$ ) ausweisen. Schon Dreitrefferfunktionen kommen wegen ihrer stärkeren Krümmung im Anfangsteil bei Berücksichtigung der eingetragenen Fehlergrenzen nicht in Frage, wie eine Betrachtung der gepunktet eingetragenen Dreitrefferfunktion ( $n = 3$ ) unmittelbar ergibt.

Nach der Theorie quantenbiologischen Treffergeschehens (z. B. TIMOFEEFF-RESSOVSKY und ZIMMER 1947) kann eine Zweitrefferefunktion einerseits dadurch zustande kommen, daß ein einziger Trefferbereich zweimal getroffen wird, dann gilt  $m = 1 - (\exp - \sigma D) (1 + \sigma D)$  für die Abhängigkeit der Mutationsrate  $m$  von der Strahlendosis  $D$  ( $\sigma$  = Treffwahrscheinlichkeit). Andererseits können 2 unabhängige Trefferbereiche vorliegen, deren jeder einmal getroffen werden muß. In diesem Fall gilt die quadrierte Eintrefferfunktion  $m = (1 - \exp - \sigma D)^2$ . Der Krümmungsverlauf beider Funktionen ähnelt sich so stark, daß sie in praxi sich völlig decken und also eine Unterscheidung der beiden Fälle allein durch den Kurvenverlauf nicht möglich ist, daher auf andere Weise gesucht werden muß.

Im ersten Falle, bei Zusammenwirken zweier Trefferereignisse in einem Trefferbereich, wird also die Wirkung des ersten Treffers irgendwie gespeichert, bis der zweite Treffer dann mit dem „Residuum“ des ersten zusammen den biologischen Effekt auslöst. Im zweiten Falle dagegen sind beide Trefferereignisse völlig unabhängig voneinander, können beliebig lange aufeinander warten, und die beiden veränderten Trefferbereiche bewirken durch irgendwelche Folgereaktionen den Eintritt des Effektes. Im allgemeinen dürfte die Trefferspeicherung des ersten Falls nur eine beschränkte Zeit lang möglich sein, also allmählich abklingen. Dadurch kommt es zu dem bekannten Zeitfaktoreffekt, d. h. die Wirkung einer über einen längeren Zeitraum ausgedehnten Bestrahlung bzw. diejenige von zwei oder mehreren Bestrahlungsfractionen mit längeren Pausen dazwischen ist anders (wegen des Abklingens des Trefferresiduums meistens geringer) als diejenige einer kurzzeitig oder einmalig gegebenen gleichen Strahlendosis.

Versuche mit zwei Lichtdosen und einer Pause bis zu 6 Std dazwischen, die mit *Bacterium prodigiosum* zur Entscheidung über eine mögliche Trefferspeicherung dienen sollten, zeigten jedoch keinen eindeutigen Einfluß der Dosisfractionierung. Daraus scheint sich zu ergeben,



daß jene Energiespeicherung über mindestens 6 Std möglich ist, oder auch der zweite Fall zweier unabhängiger Treffbereiche vorliegt. Fraktionierungen mit größeren Pausen verboten sich deswegen, weil ja schon die erste Bestrahlung erst nach mindestens 4 Std Anfärbungsdauer (siehe unten) ausgeführt werden konnte und dann nach mehr als zehnstündiger Anfärbung damit gerechnet werden mußte, daß die Zellen durch beginnende Teilung oder andere physiologische Veränderungen, evtl. durch die Färbung selbst, in ihrer Strahlenempfindlichkeit beeinflußt werden.

Eine andere Möglichkeit, zwischen beiden Fällen zu entscheiden, ergibt sich bei dem vorliegenden Objekt, wenn die Abhängigkeit der Mutabilität von der Farbstoffkonzentration oder auch von der Anfärbungsdauer treffertheoretisch analysiert wird, worüber weiter unten zu berichten ist.

Die Analyse der Dosisfunktion ergibt somit, unabhängig davon, ob nur ein oder zwei getrennte Treffbereiche zugrunde liegen, daß die Zwergwachsmutationen bei *Bact. prodigiosum* zwei Quanten sichtbaren Lichtes benötigen. Dabei ist die Einlagerung von photosensibilisierendem Farbstoff in die Zelle notwendig, welcher analog der Sensibilisation der photographischen Platte die sichtbaren beiden Lichtquanten absorbiert und deren Energie auf die genetisch aktiven Zellstrukturen überträgt. Daß die „Gene“ allein sichtbares Licht nicht in bemerkbarer Menge absorbieren und zu ihrer mutativen Umlagerung verwenden können, zeigt der schon früher mitgeteilte Befund (KAPLAN 1948), wonach Belichtung ungefärbter Zellen, auch bei sehr hohen Dosen, sowohl bezüglich der Mutationsauslösung als auch Teilungshemmung unwirksam ist.

Vergleichen wir die Mutationsauslösung durch Ultraviolett (KAPLAN 1948) mit der durch sichtbares Licht, so ist besonders der Unterschied in der Trefferzahl auffallend. Die naheliegende Deutung des Übergangs von der Eintrefferfunktion beim UV zur Zweitrefferfunktion beim sichtbaren Licht berücksichtigt die verschiedenen Wellenlängen und damit Energiegehalte beider Strahlungsarten. Die Quanten des wirksamen Ultravioletts entsprechen bei 200—300  $m\mu$  etwa 5—6 eV, während diejenigen des Fluoreszenzlichtes vom Erythrosin, das wohl hier aktiv ist und das um 600  $m\mu$  liegt, etwa 2 eV Energieinhalt besitzen. Es wäre nun möglich, daß die Aktivierungsenergie des größten Teils der Zwergwuchs hervorrufenden Gene durch die Quanten des Spektralgebiets, welches bei der Erythrosin-Photosensibilisierung wirksam ist, nicht mehr erreicht wird. Zur Überschreitung dieser Energieschwelle wären also schon 2 der energiearmen Lichtquanten nötig, während noch eines der energiereichen UV-Quanten ausreicht. Wir hätten hier bei Anwendung des photodynamisch wirksamen, sichtbaren Lichts bereits jene eingangs und früher (1948) erwähnte Wellenlängengrenze des mutativ wirksamen Spektralgebiets überschritten.

Wenn wir die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes (ca. 600  $m\mu$ ) in den vorliegenden Versuchen als wirksam annehmen, so ergäbe sich für die Mehrzahl der (sicherlich verschiedenartigen) Zwerggene eine Aktivierungsenergie oberhalb von 2 eV. Nach den Untersuchungen von LIECHTI et. al. (1939) liegt jedoch die Sensibilisationsgrenze biologischer Reaktionen bei photodynamischen Farbstoffen weit oberhalb der langwelligen Grenze der Fluoreszenz sowie auch der photographischen Sensibilisierung, für Erythrosin also noch oberhalb 700  $m\mu$ . Wir kämen dann zu einem Minimalbetrag der Aktivierungsenergie zwischen 1,5 und 2 eV für die *Prodigiosum*-Wuchsgene. In früheren Experimenten (KAPLAN 1947) war die Schwellenergie einiger sehr labiler Gene bei *Bact. prodigiosum* zu 0,5—0,9 eV gefunden worden. Die normalstabilen Clb-Gene von *Drosophila* ergaben eine Schwelle von etwa 1,35 eV (TIMOFEEFF-RESSOVSKY und ZIMMER 1941). Der Wert von etwa 2 eV für die hier behandelten Zwergwuchsgene des *Bact. prodigiosum*, die sicherlich zu den relativ stabilen Erbfaktoren zählen, erscheint durchaus verträglich mit diesen bisherigen Befunden. Es wird nötig sein, die Zeit- und Temperaturabhängigkeit dieser Zwergmutationen einer ähnlichen Analyse zu unterziehen, wie sie für die  $r \rightarrow w$  und  $w \rightarrow r$  Mutationen früher (1948) durchgeführt wurde. Dadurch würde neben die hier vollzogene „optische“ Bestimmung der Wuchs-Gen-Aktivierungsenergie die „thermodynamische“ als Kontrolle gestellt. Auch die Verwendung monochromatischen Lichts sowie von Farbstoffen, die bei anderen Wellenlängen absorbieren bzw. photosensibilisieren, wird weitere Aufschlüsse geben können.

Von verschiedener Seite (z. B. JORDAN 1939) und auch in einer früheren eigenen Veröffentlichung (1948) war die Keimungshemmung („Tötung“) der Bakterien durch Strahlung unter der Perspektive eines den Letalmutationen ähnlichen Vorgangs betrachtet worden, wozu die bis dahin bekannten Gemeinsamkeiten von Mutations- und Tötungsprozessen Anlaß gaben. In den hier geschilderten Experimenten ist nun ein deutlicher Unterschied zwischen beiden gefunden worden: Die photodynamische Mutation ist ein Zweitreffervorgang, die photodynamische Tötung ein Eintrefferprozeß. Das letztere wird durch die lineare Dosisfunktion des Überlebenden-Logarithmus ( $\log N$ ) klar erwiesen. Man könnte dies unter Verwendung der obigen Gedankengänge so deuten, daß die Aktivierungsenergie für die Zwerggene wesentlich höher ist als diejenige für einen Tötungsvorgang. Damit würden sich also die „Letalgene“ in quantitativer Hinsicht von jenen Wuchs-Erbeinheiten klar abheben. Falls das normale Absterben der ruhenden Bakterienzellen ein mit der Lichttötung vergleichbarer, jedoch spontaner (analog den spontanen Genmutationen durch überschwellige Wärmeschwingungen entstehender) Mutationsvorgang ist, könnte die Messung des betreffenden Temperaturquotienten über die Richtigkeit dieser Interpretation Aufschluß geben.

Ein weiterer Unterschied zwischen Lichttötungs- und -mutationsvorgang und damit zwischen den Zellbestandteilen, in denen diese Vorgänge ablaufen, wird angezeigt durch das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit eines Tötungs- zu einem Mutationstreffer. Beim Ultraviolett wurde dieses Verhältnis zu etwa 150:1 gefunden (KAPLAN 1948). Für die in der Abb. 1 dargestellte, die Kurvenpunkte deckende Zweitrefferfunktion ( $3\frac{1}{4}$  Std Anfärbungszeit) gilt eine Treffwahrscheinlichkeit  $\mu = 0,0072$  Mutationen/E. Berücksichtigt man den oben bereits angegebenen Tötungsexponenten  $\tau = 0,018$  Tötungen/E, so wird das entsprechende Verhältnis für die Lichtwirkung  $\tau:\mu = 2,5:1$ . Das Licht ist also bei gleicher Tötungsrate wesentlich stärker mutationsauslösend als das Ultraviolett (siehe Abb. 1, gestrichelte UV-Kurven). Damit wird aber das früher aus den UV-Befunden mit dem Vorbehalt gleicher Treffwahrscheinlichkeiten für Letalprozesse und Vitalmutation geschlossene Verhältnis von Letal- zu Vital-„Genen“ sehr unwahrscheinlich; denn offensichtlich ist das Verhältnis beider Treffwahrscheinlichkeiten sehr stark abhängig von der verwendeten Strahlung. Während beim UV auf ein Vitalgen 150 letale Trefferbereiche zu kommen scheinen, kämen beim sichtbaren Licht nur 3 letale auf ein vitales Gen. Die mit dem UV-Wert errechnete Mindestgenzahl ist damit natürlich fraglich geworden.

Die Ursache für den gefundenen Unterschied im Mutations/Tötungs-Quotienten kann wohl nur in einem erheblich unterschiedlichen Aufbau der zugehörigen Trefferbereiche gesucht werden. Dem sichtbaren Licht erscheinen die Letalbereiche ganz wesentlich „kleiner“ als dem UV (bezogen auf die Mutationstrefferbereiche), was natürlich nicht in einer räumlichen Verkleinerung beruht, sondern in einer starken Verminderung der Wirkungswahrscheinlichkeit eines absorbierten Lichtquants gegenüber dem UV. Da aus weiter unten zu besprechenden Ergebnissen gefolgert werden muß, daß schon die Anlagerung eines einzigen Farbstoffmoleküls an den Gentreffbereich die Lichtempfindlichkeit eines Zwergwuchsgens erhöht, ist es unwahrscheinlich, daß die für die Tötung verantwortlichen Zellorganelle wesentlich weniger Farbstoff anlagern, als die Wuchsgene. Vielmehr dürfte der geringe Wirkungsquerschnitt auf eine weniger gute Übertragung der im Farbstoff absorbierten Energie auf das letalitätserzeugende Organell zurückzuführen sein.

Betrachten wir andererseits die starke Bevorzugung des Letalvorganges beim UV als Auswirkung einer größeren Quantenausbeute bei der Tötung gegenüber der Mutation, so könnte dies auf einem höheren Gehalt der Letalorganelle an Thymonucleinsäure im Gegensatz zu den Verzweigungsgenen beruhen, welche Substanz ja durch Untersuchung der Wirkungsspektren als die UV-aktive (zumindest für die Tötung) erwiesen ist. Diese letztere Deutung dürfte zutreffend sein, da ja der



Ionisationsdichte-Effekt bei *Bacterium coli* (Verminderung der Wirksamkeit der dichter ionisierenden Strahlungen) schon beim Übergang von den  $\beta$ - zu den  $\gamma$ -Strahlen (z. B. LEA et al. 1941) nur einige wenige, gegenüber den Genen relativ große Tötungstreffbereiche anzeigt (etwa 2 von 34  $m\mu$  Durchmesser), die vielleicht mit den stark nuklealpositiven „kernähnlichen“ Körpern in der Bakterienzelle zusammenhängen. Damit bestünde zwischen Wuchsgenen und „Letalorganellen“ ein so erheblicher Unterschied, daß es nicht mehr angängig ist, die Eintreffer-Tötung der Bakterien als identisch oder nahe verwandt mit einer Letalmutation zu betrachten.

Noch zu veröffentlichende Untersuchungen der Ultraviolett- sowie photodynamischen Tötung und Mutabilität von Sporen des Pilzes *Penicillium notatum*, bei denen keine Zurückdrängung der Tötung zugunsten der Mutationsauslösung bei Verwendung sichtbaren Lichts gegenüber UV festgestellt wurde, scheinen anzuzeigen, daß jener auffällige Effekt vielleicht nur auf die Bakterien beschränkt ist. Möglicherweise könnten die eben bekannt gewordenen interessanten Befunde von KELNER (1949) an *Streptomyces*-Sporen zur Erklärung der geringen Letalwirkung der Photodynamie beitragen. Nach diesem werden durch Ultraviolett „abgetötete“, d. h. also, wie oben schon betont, in ihrer Keimung gehemmte Sporen dieses *Actinomyceten* durch intensive Belichtung in einem sehr erheblichen Prozentsatz wieder zum „Leben“, d. h. also zur Kolonie-Bildung erweckt. Es könnte nun sein, daß in den vorliegenden Experimenten eine vielleicht starke photodynamisch ausgelöste Keimungshemmung durch die gleichzeitig erfolgende starke Belichtung wieder rückgängig gemacht wird, während die Mutationen keine derartige Regeneration zeigen. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, einen Anschluß an die Befunde KELNERS im skizzierten Sinne zu suchen. Auf jeden Fall zeigt auch diese zunächst nur bei Bakterien nachgewiesene Reversibilität der Strahlen-„Tötung“, welcher erheblicher Unterschied in der Natur der Eintreffertötung und der Mutation der Bakterien besteht.

### 3. Abhängigkeit der Mutationsrate von der Erythrosinkonzentration.

Nachdem es klar war, daß die Einlagerung eines photodynamisch wirksamen Farbstoffes in die Bakterienzelle zur Auslösung von Mutationen durch sichtbares Licht führt, lag es nahe, die Abhängigkeit der Sensibilisierung von der Farbstoffkonzentration zu prüfen. Man darf ja annehmen, daß der Farbstoff an die genetischen Strukturen adsorbiert wird und dadurch diese „farblosen“ Strukturen befähigt werden, das von ihnen sonst nicht absorbierte Licht aufzunehmen und so zu mutieren. Voraussetzung ist, daß die Farbstoffmoleküle in einer solchen Weise gebunden werden, daß die darin aufgenommene Lichtenergie von den mutierenden



Atombauten übernommen werden kann. Es ist also nicht von vornherein von jedem durch die Zelle aufgenommenen Farbstoff zu erwarten, daß er diese Energieüberleitung vornehmen kann. Vielleicht ist es später einmal möglich, von der Art der energieleitend gebundenen Farbstoffe auf die Art der mutierenden Atomgruppen zu schließen und also die Genoberfläche mit Hilfe spezifisch strukturierter Farbstoffe „abzutasten“.

Hauptziel der Konzentrationsversuche war, zwischen der Hypothese eines zusammenhängenden Treffbereichs und zweier unab-

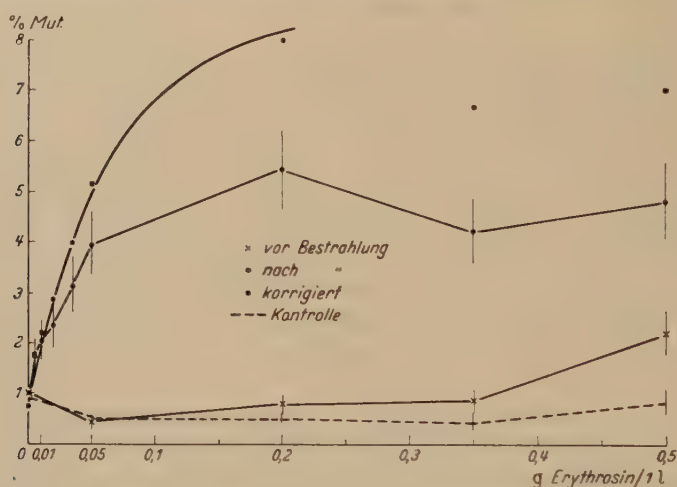


Abb. 2. *Bacterium prodigiosum*. Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration. 20° C, 120 min Anfärbung,  $3 \cdot 10^6$  erg cm<sup>2</sup>. ----- Kontrolle, + vor Bestrahlung, · nach Bestrahlung, — korrigiert.

hängiger Treffbereiche zu entscheiden. Wenn nämlich nur ein einziger Treffbereich vorhanden ist, der durch 2 Lichtquanten zur Mutation angeregt wird, so müßte die Konzentrationsabhängigkeit eine Eintrefferkurve ergeben; denn jedes an diesen einen Treffbereich angelagerte Farbmolekül könnte ja beide notwendigen Lichtquanten aufnehmen. Liegen dagegen 2 getrennte Treffbereiche vor, so muß jeder mindestens ein Farbmolekül anlagern, wenn es zur Mutation durch darin absorbiertes Licht kommen soll. Dann ergäbe sich also die oben erwähnte quadrierte Eintrefferfunktion, deren Verlauf mit der „echten“ Zweitreffeffunktion identisch ist. In diesem letzteren Falle käme dann die oben ausgeführte Deutung der gefundenen Zweitreffeffunkture der Lichtdosis-Abhängigkeit nicht in Frage, weil diese ja die Absorption zweier sichtbarer Quanten im gleichen Treffbereich annimmt, deren Einzelenergie die Aktivierungsenergie für die Mutation noch nicht erreicht.

Das Ergebnis eines Versuchs mit Variation der Farbstoffkonzentration ist in der Abb. 2 dargestellt. In der Senkrechten ist wiederum der Prozent-

satz gefundener Mutationen, in der Waagerechten die Konzentration des Farbstoffes in Gramm Erythrosin/Liter aufgetragen. Für jede Konzentrations-, „Dosis“ wurden  $10\text{ cm}^3$  Farblösung mit  $0,5\text{ cm}^3$  der gleichen Zellsuspension beimpft. Sofort nach Beimpfung wurden Kontrollplatten ausgespatelt (deren Mutationsrate als gestrichelte Kurve dargestellt ist). Dann wurden die Suspensionen 120 min lang im Dunkelthermostaten bei  $20^\circ\text{C}$  zwecks Einwirkung des Farbstoffes gehalten und nach dieser Zeit wiederum Zählplatten vor der Bestrahlung mit 70 E ( $3,10^7\text{ erg cm}^{-2}$ ) und nach dieser abgeimpft.

Da besonders die höheren Farbstoff-Konzentrationen einen erheblichen Teil des Lichtes absorbierten, wurde die Durchlässigkeit der etwa 3 cm dicken Farblösungs-Schichten mit dem Photoelement gemessen. Um den wahren Verlauf der Mutationsrate in Abhängigkeit von der Farbstoff-Konzentration bei gleicher Dosis zu bekommen, mußte der von der Farbstoff-Lösung bei den verschiedenen Konzentrationen ja verschiedene absorbierte Anteil der Lichtdosis berücksichtigt werden. (Bei den früheren Dosisversuchen war eine solche Korrektur nicht notwendig, weil der Verlustfaktor wegen der gleichen Farbstoffkonzentration bei allen Dosen konstant war.) Da wegen der inhomogenen Durchleuchtung der Suspension das Exponentialgesetz der Absorption-Konzentration-Abhängigkeit, besonders bei den höheren Konzentrationen, nicht strenge Gültigkeit hat, stellt die vorgenommene Korrektur nur eine Näherung dar.

Wird der Abfall der Intensität in der Schicht nach  $i = \exp - sk$  angesetzt, wobei  $i$  die Durchlässigkeit in Prozent,  $s$  die Schichtdicke der Farblösung und  $k$  eine konzentrationsproportionale Konstante bedeutet, so ergibt sich die integrale Intensität, welche auf die Zellen eingewirkt hat, zu  $I = \int_0^s (\exp - ks) ds/s = (1 - \exp - ks)/ks$ . Da die Durchlässigkeit  $i$  für verschiedene Konzentrationen in konstanter Schichtdicke  $s$  gemessen wurde, ergibt sich wegen  $ks = -\ln i$  die integrale Intensität zu  $I = (1 - i)/\ln i$ . Die wirklich empfangenen Dosen lagen also um den Faktor  $I$  niedriger als die konstante Einfallsdosis von 70 E. Die gefundenen Mutationsraten erhöhen sich demnach um Beträge, die unter Berücksichtigung der Zweitreffeffunktion den Dosen  $70/I$  Einheiten entsprechen. Die nach dieser Korrektur gewonnenen Mutationsraten sind als Quadrate in der Abbildung eingetragen.

Wir stellen fest, daß bei etwa 0,2 g/l nach 2ständiger Färbedauer die maximal-photodynamisch wirksame Anfärbung erreicht ist. Der anscheinend vorliegende Abfall dieser Wirksamkeit bei höheren Konzentrationen ist wahrscheinlich auf die dann besonders starken Fehler durch die Inhomogenität der Einstrahlung zurückzuführen. Es könnte allerdings sein, daß er auch in tatsächlichen Veränderungen der Photosensibilität der Zellen begründet ist, welche von einer sich vielleicht auf den physiologischen Zellzustand auswirkenden starken Farbstoffaufnahme

verursacht wird. Wird doch weiter unten davon berichtet, daß auch bei längeren Anfärbungsdauern ein solcher Abfall bemerkbar ist.

Die gefundene Folge experimenteller, korrigierter wie nicht korrigierter Mutationsraten ordnet sich, wie die Abbildung zeigt, gut einer Eintrefferfunktion ein, welche ihren Sättigungswert bei etwas über 8% Mutationen besitzt. Dieser Wert stellt die maximale photodynamische Wirkung unter den gegebenen Versuchsbedingungen dar. Eine Zweitrefffunktion kommt wegen der geringen Krümmung im Anfangsteil kaum in Frage. Damit ist aber wahrscheinlich gemacht, daß zur Erhöhung der Photosensibilität nicht 2 Farbstoffmoleküle, wie es der Fall zweier getrennter Treffbereiche erfordern würde, notwendig sind, sondern schon die Anlagerung eines einzigen an den einen, zusammenhängenden energiespeicherungsfähigen Treffbereich. Dieser Befund entspricht durchaus der oben gemachten Annahme über die Summierung zweier zu energieärmer Lichtquanten im Gentreffbereich zwecks Überschreitung der Aktivierungsenergie.

Die experimentellen Ergebnisse dieser Konzentrationsversuche haben nun noch ein überraschendes Ergebnis gezeitigt: Bei der höchsten Farbstoffkonzentration von 0,5 g/l und in schwächerem Maße schon bei niederen Konzentrationen hat die Farbstoffeinlagerung in die Zelle offenbar auch schon ohne Belichtung Zwergwachsmutationen ausgelöst. Der Unterschied zwischen Kontrolle und Anfärbung nach 120 min kann als statistisch ziemlich gesichert angesehen werden (Kontr. 10/1200 = 0,83  $\pm$  0,83% Mutanten, Anfärbung nach 120 min 0,5 g/l ergab 21/967 = 2,18  $\pm$  1,32%, Diff./ $m_{\text{Diff}}$  = 3.1,34/1,58 = 2,55,  $P$  = 1,1%). Wir werden weiter unten sehen, daß diese mutagene Wirkung des Farbstoffs erheblich temperaturabhängig ist. Weitere noch in Arbeit befindliche Versuchsreihen erhärteten den hier erstmalig gemachten Befund. Die Ergebnisse der biophysikalischen Analyse dieser „chemischen“ Mutationsauslösung durch bloße Vitalfärbung mit Erythrosin (auch Methylenblau und andere Farbstoffe erwiesen sich aktiv) werden nach Abschluß anderweitig mitgeteilt. Daß die „chemogenen“ Zwergkolonien tatsächlich genetische Varianten sind, wurde durch Nachkulturen gesichert. Das Ergebnis fügt sich den von DEMEREC (1948) mitgeteilten Befunden über die mutagene Wirkung vieler verschiedenartiger chemischer Verbindungen ein.

#### *4. Abhängigkeit der photodynamischen Mutabilität von der Anfärbungsdauer.*

Wenn die Photosensibilisierung der Erbsubstanz des Bakteriums dadurch entsteht, daß einzelne Farbstoffmoleküle an die Genstrukturen angelagert werden, so muß die Vergrößerung der Wahrscheinlichkeit, mit der die Farbstoffmoleküle an die Gene stoßen, eine Vermehrung der

angelagerten Moleküle und damit eine Verstärkung der Photoreaktion ergeben. Die Erhöhung der Farbstoffkonzentration war ein solches Mittel zur Vergrößerung dieser Wahrscheinlichkeit. Wenn das entworfene Wirkungsmodell richtig ist, so muß eine einfache Verlängerung der Dauer der Farbstoff-Einwirkung in genau der gleichen Weise wie die Konzentrationserhöhung, nämlich in einer Eintrefferfunktion, die Sensibilität vermehren. Denn in beiden Fällen kommt es auf eine Erhöhung der Gesamt-Stoßzahl der Farbstoffmoleküle bis zur Bestrahlung hinaus.

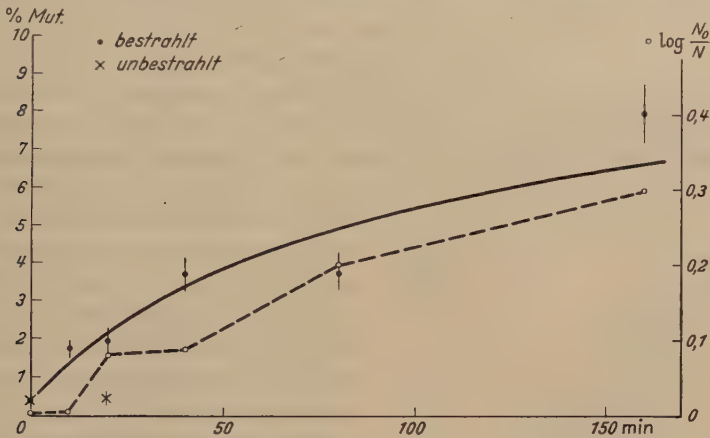


Abb. 3. *Bacterium prodigiosum*. Anfärbungszeit-Abhängigkeit Erythrosin 1:20000, 20° C. Lichtdosis  $3 \cdot 10^8$  erg  $\text{cm}^{-2}$ .

Damit ergab sich auch die Untersuchung der Mutationsrate in Abhängigkeit von variabler Anfärbungsdauer bei konstanter Erythrosinkonzentration und konstanter Lichtdosis als ein Mittel zur Prüfung der Arbeitshypothese. In Abb. 3 ist das Ergebnis eines derartigen Versuches graphisch dargestellt. Diesmal ist auf der Horizontalen die Zeit aufgetragen, während welcher der Farbstoff vor der Bestrahlung eingewirkt hatte. Da hier nur der Anfangsteil der Kurve von Bedeutung für die Art der Trefferfunktion ist, wurde in diesem Versuch die Anfärbungszeit nur bis 160 min variiert. Während dieser Zeit war die „chemische“ mutagene Wirkung des Farbstoffes noch ohne Bedeutung. Sie wurde in anderen Versuchen erst ab etwa 4 Std bemerkt. Von diesem Zeitpunkt ab zeigte sich auch der schon oben erwähnte gelinde Abfall der lichtinduzierten Mutationsrate mit der Anfärbungszeit.

Die in dem demonstrierten Versuch gewonnene Folge von Kurvenpunkten der Licht-Mutabilität paßt sich wiederum der eingezeichneten Eintrefferkurve an. Damit ist aber ein weiteres Indizium für die Annahme gewonnen, daß die Anlagerung der Farbstoffmoleküle ein Eintreffergeschehen darstellt.



Außer der Mutationsrate ist in dem Graphikon noch der Logarithmus des Keimverlustes ( $\log N_o/N$ ) eingezeichnet. Wir sehen, daß dieser gleichsinnig mit der Mutationsrate zunimmt. Eine genauere Entscheidung über die zugrunde liegenden Kurvenformen ist aber wegen der statistisch und durch die Verdünnung hervorgerufenen Fehler nicht möglich. Immerhin scheinen diese Punkte (hohle Kreise) wenigstens im Anfangsteil um die vermutete Eintreffer-Gerade herum zu liegen, und erst später macht sich die zu erwartende Sättigung bemerkbar.

### 5. Abhängigkeit der photodynamischen Wirkung von der Anfärbungstemperatur.

Das Nebeneinanderhergehen der „photogenen“ und „chemogenen“ Mutabilität zeigte sich auch in den Versuchen, in denen die Temperatur während der Anfärbung verschieden war. Farbstoff-Konzentrationen sowie Lichtdosis und Schichtdicke der bestrahlten Suspension wurden dabei konstant gehalten. Die Anfärbungszeit betrug im ersten Versuch, dessen Ergebnis in Abb. 4 dargestellt ist, 160 min,  $3 \cdot 10^4$  erg  $\text{cm}^{-2}$  l = 20000 Erythrosin.

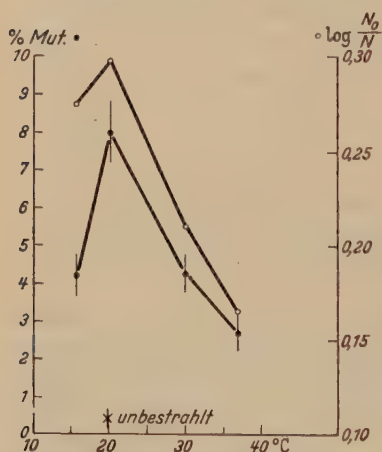


Abb. 4. *Bacterium prodigiosum*. Anfärbungstemperatur 160 min,  $3 \cdot 10^4$  erg  $\text{cm}^{-2}$  l = 20000 Erythrosin.

Bei längerer Anfärbungsdauer (Abb. 5) bemerken wir gleichfalls wiederum das Optimum bei etwa 20–25°C. Bei höheren Temperaturen (37° und 42°C) ist jedoch wiederum ein Anstieg der Mutabilität zu bemerken. Betrachten wir die Mutationsraten, die vor der Bestrahlung, aber nach der längeren Anfärbungszeit im Dunkeln vorhanden waren, so finden wir eine klare Zunahme bei den beiden höheren Temperaturen gegenüber dem Ausgangswert (Kontr.). Es ist hier also der größte Teil der nach der Bestrahlung festgestellten Mutanten bereits vor der Bestrahlung durch die chemische Wirkung des Farbstoffs erzeugt worden. Die Differenz zwischen nach und vor der Bestrahlung gemessenen Mutations-

raten, die ja dem Anteil der photodynamisch entstandenen Mutabilität entspricht, liegt bei den hohen Temperaturen tiefer als bei der optimalen. Es erweckt den Anschein, als ob die bei den höheren Temperaturen und längerer Anfärbungsdauer von der Zelle aufgenommenen Farbstoff-Moleküle bei den meisten angefärbten Zellen durch „Gift“-Wirkung, also chemogen, mutierend wirken, so daß dann nur noch ein kleiner Rest an Zellen, die genügend Farbstoff aufgenommen haben, für die rein

photogene Mutationsauslösung übrigbleibt. Die bei der kürzeren Anfärbungszeit zustande gekommene Temperaturkurve vom Optimumstyp legt den Gedanken nahe, daß sie die Auswirkung eines

Permeabilitätseffektes ist. Die starke chemogene Mutationsauslösung durch den Farbstoff bei höherer Temperatur und längerer Anfärbungsdauer deutet jedoch darauf hin, daß die Permeabilität des Farbstoffs allein für die Temperaturabhängigkeit seiner mutagenen und photodynamischen Wirksamkeit nicht verantwortlich ist.

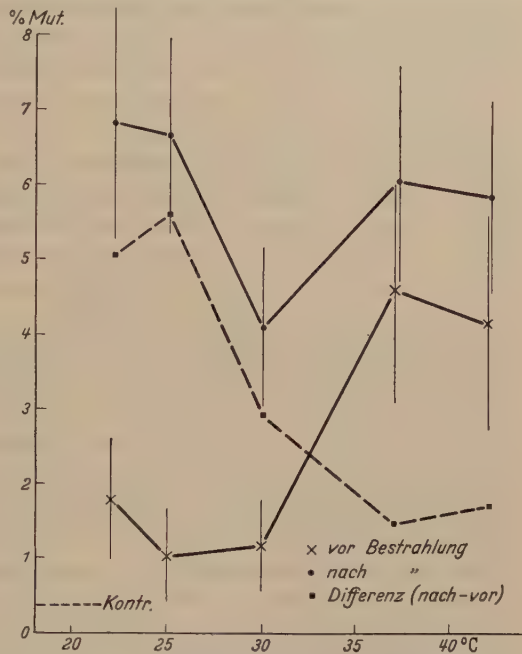


Abb. 5. *Bacterium prodigiosum*. Anfärbungstemperatur 240 min,  $3 \cdot 10^6$  erg cm<sup>-2</sup>, 1:20 000 Erythrosin.

Die vorgelegten Ergebnisse mögen bereits eine gewisse Modell-Vorstellung über die Wirkungsweise photosensibilisierender Farbstoffe auf das genetische System der Bakterienzelle und über diese genetische Konstitution selbst verdeutlicht haben. Viele der angeschnittenen Probleme, insbesondere die merkwürdige retardierte Genodispersion, die Wellenlängenabhängigkeit der Trefferzahl, sowie auch die chemogene Mutationsauslösung durch Vitalfarbstoffe, müssen aber der Aufhellung durch zukünftige Untersuchungen überlassen bleiben.

### Zusammenfassung.

1. Ruhende Zellen aus 2—3 täglichen Kolonien von *Bacterium prodigiosum* wurden in wäßriger Erythrosinlösung suspendiert und nach einer

gewissen Zeit der Farbstoffeinwirkung mit dem sichtbaren Licht einer Zeiß-Mikroskopierlampe bestrahlt. An den abgeimpften Zählplatten zeigte sich, daß die Keimzahl vermindert und die %-Zahl von Zwergkolonien erhöht war.

2. Nachkulturen der Zwergkolonien erwiesen den erblichen Charakter des Zwergwuchses, der durch eine gegenüber dem Ausgangsstamm verminderte Wachstumsrate der mutierten Zellen verursacht ist.

3. Messungen der Durchmesser wachsender Kolonien in der 1. Nachkultur aus strahleninduzierten Zwergkolonien ergaben i. a. eine eingipflige Verteilung um den gegenüber Normal herabgesetzten Mittelwert. In 2 Fällen wurde eine 2- bzw. 3gipflige Verteilung gefunden, welche die Anwesenheit von 2 bzw. 3 Genotypen in der verzweigten Elterkolonie anzeigt. In 2 Nachkulturen ergaben sich überraschenderweise wieder eingipflige Verteilungen, die Genotypen waren also offenbar von dem früheren „labilen“ Zustand nach der Bestrahlung in einen erblich stabilen Zustand übergegangen. Zur Erklärung dieses eigenartigen Vererbungsmodus, der als „retardierte Genodispersion“ bezeichnet wird, wird eine Entmischung von  $\pm$  frei in der Zelle vorhandenen Erbeinheiten erwogen, für die auch Parallelen in früheren eigenen Versuchen, in den „verzögerten“ Mutationen von *Bact. coli* (DEMEREK) und der plasmatischen Erbvariation höherer Pflanzen (MICHAELIS) gesehen werden.

4. Die Abhängigkeit der photodynamischen Mutabilität von der Lichtdosis entspricht einer 2-Trefferfunktion, die photodynamische „Tötung“ (Keimungshemmung) einem Eintreffergeschehen. Die Ursache für den Unterschied gegenüber der Eintrefferkurve im UV wird in der geringen Quantenenergie des wirksamen sichtbaren Lichtes gesucht, die zum Erreichen der Aktivierungsenergie der Zwergwuchs-Mutationen nicht ausreicht. Demnach dürfte die Aktivierungsenergie für die Mutationen oberhalb 1,5—2 eV liegen, diejenige für die „Tötung“ unter diesem Wert.

5. Die Empfindlichkeit der Keimungshemmung („Tötung“) des *w*-Typs war bei Lichtbestrahlung  $> 2,3$  mal größer als die des *r*-Typs; gegenüber der UV-Strahlung waren die *w*-Zellen dagegen nur  $> 1,6$  mal empfindlicher als die des *r*-Typs.

6. Das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit eines „Tötungs“treffers zu der eines Mutationstreffers ist bei der photodynamischen Wirkung etwa 3:1, während es im UV-Gebiet ca. 150:1 war. Die Ursache für die stärkere Tötung im UV könnte in einem größeren Thymonucleinsäuregehalt der „Tötungs“-Zentren oder auch in der die Keimungshemmung aufhebenden Wirkung des sichtbaren Lichtes (KELNER) beruhen. Die Strahlentötung der Bakterien kann demnach nicht einfach als Letalmutation angesprochen werden.

7. Die Abhängigkeit der photodynamischen Mutabilität von der Erythrosin-Konzentration (bei konstanter Lichtdosis, Anfärbungszeit und -temperatur), ergab eine Eintrefferkurve. Daraus wird geschlossen,



daß zur Erhöhung der Photosensibilität bereits die Anlagerung eines Farbstoffmoleküls an den Treffbereich für eine Mutation ausreicht. Die Möglichkeit, die 2-Trefferkurve durch Annahme zweier getrennter Treffbereiche (quadrierte Eintrefferfunktion) zu deuten, entfällt damit.

8. Auch die Variation der Anfärbungsdauer bei sonst konstanten Bedingungen ergibt eine Kurve, die sich der Kurve der Konzentrationsabhängigkeit, also einer Eintrefferfunktion, anschließt.

9. Die Abhängigkeit der reinen photodynamischen Mutabilität von der Temperatur während der Anfärbung entspricht einer Optimumskurve mit einem Optimum bei 20—25° C.

10. Bei höheren Farbstoff-Konzentrationen, längeren Färbedauern und höheren Temperaturen macht sich eine Auslösung von Zwergwuchs-Mutationen allein durch die „Gift“-Wirkung des Farbstoffes, also ohne Belichtung, deutlich bemerkbar. Eine nähere Analyse dieser „chemogenen“ Mutabilität, die auch mit anderen Farbstoffen (z. B. Methylenblau) beobachtet wurde, ist vorgesehen.

### Literatur.

- DEMEREK, M.: Induced mutations and possible mechanisms of the transmission of heredity in *Escherichia coli*. Proc. nat. Ac. USA. **37**, 36—40 (1946); Chemical mutagens. 8. internat. Kongr. für Genetik in Stockholm. Abstract Book (1948). — DÖRING, H.: Photosensibilisierung der Gene? Naturwiss. **26**, 819 (1938). — JORDAN, P.: Strahlenbiologie der Bakterien. Experiment und Theorie. Protoplasma **32**, 464 (1939). — KAPLAN, R.: Versuche an *Antirrhinum majus* über die Häufigkeit von Faktormutationen nach Röntgenbestrahlung des Pollens in verschiedenen Quellungszuständen. Z. f. Vererbl. **82**, 164—186 (1943/48); Spontane Mutabilität bei *Bacterium prodigiosum*. Z. f. Nat. Forsch. **2b**, 308—312 (1947); Ultraviolett-Mutabilität bei *Bacterium prodigiosum*. Z. f. Nat. Forsch. **3b**, 29—35 (1948); Auslösung von Mutationen durch sichtbares Licht im vitalgefärbten *Bacterium prodigiosum*. Naturwiss. **4**, 127 (1948); Mutationen bei *Bacterium prodigiosum* als quasi-monomolekulare Prozesse. Zbl. Bakter. I, **153**, 129—133 (1949); Mutations by photodynamic action in *Bact. prodigiosum*. Nature **163**, 573 (1949). — KELNER, A.: Wirkung des sichtbaren Lichtes auf die Erholung von *Streptomyces-griseus*-Konidien von der UV-Strahlenschädigung. Proc. nat. Acad. Sci. USA. **35**, 73—79 (1949). — KOLLER, S.: Handbuch der Erbbiologie des Menschen. II. Band. Verlag Springer, Berlin (1940). — LEA, D. E., A. B. HAINES and E. BRETSCHER: The bactericidal action of X-rays, neutrons, and radioactive radiations. Jour. Hyg. **41**, 1 (1941). — LEDERBERG, J.: Gene recombination and linked segregation in *Escherichia coli*. Genetics **32**, 505—525 (1947). — LIECHTI, A., L. FEISTMANN, u. E. GÜGENHEIM: Über die biologische Wirkung von Sensibilisatoren im langwelligen, sichtbaren Licht. Strahlentherapie **62** (2), 353—367 (1939). — LINCOLN, R. E.: Production and rate of mutation in *Phytomonas steudarii* by X-radiation. Genetics **25**, 125 (Abstract) (1940). — LURIA, S. E.: Recent advances in bacterial genetics. Bact. Rev. **11**, 1—40 (1947). — MICHAELIS, P.: Über einige Abänderungen an reziprok verschiedenen *Epilobium hirsutum*-Bastarden. Z. f. Vererbl. **82**, 197—229 (1944/48). — TIMOFEEFF-RESSOVSKY, N. W.: Mutationsforschung in der Vererbungslehre. Verlag Steinkopff (1937). — TIMOFEEFF-RESSOVSKY, N. W., u. K. G. ZIMMER: Über Zeitproportionalität und Temperaturabhängigkeit der spontanen Mutationsrate von *Drosophila*. Z. f. Vererbl. **79**, 530—537 (1941).



(Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Aachen.)

## Stalaktiten-Fruchtkörper von *Merulius lacrymans* var. *domesticus*.

Von

ALPHONS THEODOR CZAJA.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 11. Juni 1949.)

Die Fruchtkörper des echten Hausschwammes, *Merulius lacrymans* (Wulfen) Schum., treten entsprechend der Existenz zweier Formenkreise in zwei verschiedenen Ausbildungsweisen auf (ULBRICH 1941):

1. mit fleischigen, ergossenen, bisweilen konsolenartigen Fruchtkörpern (in diesem Falle meist mit hydroidem Hymenium), Waben des Hymeniums ziemlich eng mit fleischigen Wandungen = var. *domesticus* (Pers.) FALCK 1907 pro spec.;
2. mit dünnhäutigen, stets ergossenen Fruchtkörpern, sehr selten mit hydroidem Hymenium, Waben meist mit dünnen Wandungen = *Merulius silvester* FALCK 1907 emend. ULBRICH.

Es handelt sich also um flach ausgebreitete Fruchtkörper, welche der Unterlage anliegen oder seltener konsolenartige Ausbildung zeigen. Nach Angaben von MEZ (1908) und LIESE (1928) und eigenen Beobachtungen treten flache Fruchtkörper an horizontalen Flächen (Fußboden, Decke) auf, polster- und konsolenförmige am Ende von Mycelsträngen, an Spalten und Mauerritzen. Außer konsolenförmigen Fruchtkörpern bei *Merulius lacrymans* var. *domesticus* erwähnt FALCK (1912) nur die selten an der Oberfläche auftretenden kraterelloiden trichterförmigen Fruchtkörper.

Unter den besonderen Entwicklungsbedingungen von langanhaltendem extremem Wasserzufluß hatte ich Gelegenheit, bei der var. *domesticus* stark abweichende Fruchtkörperbildung zu beobachten, welche allem Anschein nach bislang noch nicht festgestellt worden ist. Diese soll im folgenden kurz beschrieben werden.

Die Entwicklung des *Merulius* erfolgte in dem hölzernen Fußbodenwerk des Untergeschosses eines Gebäudes, welches mehrere Jahre ohne Dach den atmosphärischen Einwirkungen ausgesetzt war. Das Regenwasser sammelte sich in dem Untergeschoß und versickerte von hier durch den Holzfußboden in die gemauerte Gewölbedecke des Kellergeschosses. Auf diesem Wege folgte es den Fugen zwischen den Ziegeln und tropfte infolgedessen an zahlreichen Stellen in parallelen Längsreihen von der Gewölbedecke ab.

In dem Holz des Fußbodens fand der Pilz eine ausgiebige Kohlenstoffquelle, welche ihn in die Lage versetzte, ein weitverzweigtes, überaus kräftiges Mycel zu bilden, was durch die zahlreichen und dicken Stränge

belegt wird. Die wachsenden Hyphen fanden den Weg durch die weitverzweigten Mauerfugen an die Unterfläche der Gewölbedecke des Kellers. Hier erfolgte die Entwicklung eines großen Fruchtkörpers von mehreren Quadratmetern. Seine Ausbildung war, soweit er der Decke flach anlag, durchaus die bekannte, flache, mit dem faltigen Hymenium und der etwas dickeren hellen Berandung. Von der Fläche des Fruchtkörpers hingen aber in Parallelreihen bis etwa 6 cm lange, teils kugelige, teils mehr kegelförmige oder ähnlich gestaltete Mycelgebilde herab. Die Oberfläche dieser Bildungen war mit dem wabigen Hymenium überzogen, wobei der Stielfortsatz einbegriffen sein oder frei bleiben konnte. In weiterem Umfange war an diesen abwärtshängenden, stalaktiten-

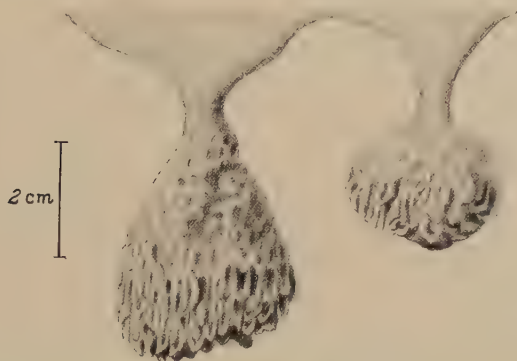


Abb. 1 Stalaktitenartige Auswüchse eines Fruchtkörpers von *Merulius lacrymans* var. *domesticus*.

artigen Fruchtkörpern das Hymenium aber hydroid ausgebildet, d. h. es waren statt der wabigen Falten 5—8 mm lange Stacheln bzw. zahnartige Fortsätze gebildet, welche an ihrer Oberfläche das Hymenium trugen (Abb. 1). An den älteren Teilen des Fruchtkörpers an der Gewölbedecke waren nun in ebenso vielen langen Parallelreihen zahlreiche derartige stalaktitenartige Fruchtkörper bzw. Fruchtkörperauswüchse entwickelt, wie Mauerfugen unter dem Fruchtkörper vorhanden waren. Die Entstehung dieser ungewöhnlichen Fruchtkörperbildung muß also mit den Mauerfugen in ursächlichem Zusammenhang gestanden haben.

Nach einer Seite zu war am Rande des Fruchtkörpers die Entwicklung auf frühem Stadium stehengeblieben. Hier waren nun wiederum in Parallelreihen entlang den Fugen dicke, runde bis elliptische Mycelpolster von 5—10 cm Durchmesser aufgetreten. Manche dieser Polster waren noch isoliert, andere aber flossen mit den benachbarten zu größeren Komplexen zusammen. In der Mitte eines jeden derartigen Mycelpolsters war eine mehr oder weniger dicke Vorwölbung zu erkennen, in der sich ein Loch befand, aus welchem Wasser abtropfte. An den älteren der-

artigen Bildungen formte sich das wachsende Mycel um das abtropfende Wasser zu einer Röhre. Alle diese noch unvollständigen Bildungen setzten die Parallelreihen der Stalaktitenfruchtkörper fort. Das Loch in der Mitte der Mycelpolster stellte die Bahn des reichlich abtropfenden Wassers dar. Das Pilzmycel war allem Anschein nach an allen Tropfstellen jeweils um den sich bildenden Tropfen herumgewachsen. An der Luft hatten sich auf diese Weise Mycelkörper gebildet, welche sich dann in ihrem unteren Teile infolge der Menge des capillar festgehaltenen Wassers zu einer mehr oder weniger kugelartigen Bildung erweiterten.

Der gesamte Fruchtkörperkomplex an der Gewölbedecke ist seiner Entstehung nach so aufzufassen, daß zunächst an zahlreichen Stellen der Decke aus den Mauerfugen mit dem abtropfenden Wasser einzelne runde bis ovale Mycelpolster hervorstachen, in deren Mitte je ein stalaktitenartiger Fortsatz in Bildung begriffen war. Bei der seitlichen Ausbreitung der Mycelpolster gelangten diese in gegenseitige Berührung und verwuchsen miteinander. Auf diese Weise kam die mehrere Quadratmeter große Myceldecke zustande, welche sich an ihrer Oberfläche mit dem in üblicher Weise ausgebildeten Hymenium bedeckte. Dabei kamen nun die zahlreichen Stalaktiten auf den Gewebepolstern mitten in die Hymeniumbildung zu liegen und überzogen sich selbst zunächst an dem angeschwollenen unteren Teil mit diesem. Darüber hinaus überzog das Hymenium z. T. auch die Stielansätze. Es ist anzunehmen, daß die Hymeniumbildung erst erfolgte, als die Ausbreitung der Hauptmenge des durch die Gewölbedecke durchsickernden Wassers sich weiter ausbreitete, so daß die älteren Teile des Fruchtkörpers weniger stark mit Wasser durchsetzt waren.

Daß es sich bei dieser ganz ungewöhnlichen Art der Fruchtkörperbildung tatsächlich nur um eine entwicklungsphysiologische Besonderheit handelt, geht aus der Ausgestaltung der jüngsten Teile hervor. Hier ist offenbar der Zustrom des Wassers schon geringer gewesen, so daß es nicht mehr zum Abtropfen von der Gewölbedecke gekommen ist. Der Fruchtkörper war nun wieder vollkommen in der üblichen Weise als flacher Kuchen entwickelt ohne die geringste Erhebung auf seiner Oberfläche.

### Literatur.

FALCK, R.: Die *Merulius*-Fäule des Bauholzes. Hausschwammforschungen. Jena 1912, Heft 6. — LIESE, JOH.: Zerstörung des Holzes durch Pilze in: MAHLKE-TROSCHEL, Handbuch der Holzkonservierung, 2. A. Berlin 1928. — MEZ, C.: Der Hausschwamm und die übrigen holzerstörenden Pilze der menschlichen Wohnungen. Dresden 1908. — ULBRICH, E.: Hausschwamm, Naßfäulen (Trockenfäulen) und andere Zerstörer unserer Häuser und Bauten. Berlin 1941.

(Aus der Biochemischen Abteilung des Organisch-Chemischen Institutes der  
Universität Göttingen.)

## Stoffwechselversuche an Actinomyceten.

Von

**E. DIETZEL, H. BEHRENBRUCH und M. EUCKEN.**

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Juli 1949.)

Bei der Untersuchung einer größeren Anzahl von *Actinomyceten* (v. PLOTHO, 1947) erschien es von Interesse, sich über den Verlauf des Wachstums in flüssigem Kulturmedium zu informieren. In der Literatur fanden wir nur Angaben über die Verhältnisse bei Verwendung synthetischer Lösungen (SCHATZ, WAKSMAN u. REILLY, 1946, WOODRUFF u. RUGER, 1948). Der Zusatz von Pepton oder Fleischbrühe, wie er dort beschrieben ist, mußte aber besonders bei Untersuchung der von den Actinomyceten bei ihrem Wachstum neugebildeten Aminosäuren stark erschwerend wirken. Wir haben deshalb neben Mineralsalzen und Milchzucker nur anorganischen Stickstoff in Form von Natriumnitrat angeboten. Die Versuche wurden im Ruhekulturverfahren in 200 cm<sup>3</sup> ERLMMEYER-Kolben durchgeführt. Es wurden 30—50 Kolben mit je 50 cm<sup>3</sup> Kulturlösung angesetzt und bei der Aufarbeitung stets die Mittelwerte von 3 Kolben verwendet. Als Versuchsobjekt diente ein Actinomycetenstamm, der sich durch die Produktion eines gelben, antibiotisch wirkenden Farbstoffes — Actinochrysin genannt<sup>1</sup> — auszeichnete (Laborbezeichnung Stamm 1a). Bestimmt wurden während der Beobachtungszeit von ungefähr 30 Tagen: 1. Das Myceltrockengewicht, 2. der Gesamtstickstoff des Mycels (KJELDAHL), 3. der r<sub>H</sub>-Wert des zeriiebenen Mycels (Indikatorenmeth.), 4. der Aminostickstoff der Kulturlösung (v. SLYKE), 5. der Ammoniakgehalt der Kulturlösung (Titration), 6. der p<sub>H</sub>-Wert der Kulturlösung (elektrometrisch), 7. der Verbrauch an Milchzucker (FEHLING), 8. der Verbrauch an Natriumnitrat (Titration nach Reduktion), 9. die Menge des gelben Farbstoffes (kolorimetrisch).

Die Ergebnisse sind aus den Abb. 1 und 2 abzulesen. Das am 2. Tage nach der Beimpfung sichtbare Wachstum erreicht etwa am 10. Tag sein Maximum, das Gewicht des Mycels nimmt von diesem Tage an, durch autolytische Prozesse bedingt, stark ab. Sowohl die Kohlenstoffquelle

<sup>1</sup> Der Farbstoff hat inzwischen den Namen „Actinomycin C“ erhalten; vgl. H. BROCKMANN und N. GRUBHOFFER, Naturwiss. **36**, 376 (1949)



als auch die Stickstoffquelle sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht erschöpft. Welchen Grund das frühe Einsetzen der Autolyse hat, bleibt noch ungewiß. Ob der gelbe Farbstoff die Autolyse beschleunigt, oder ob seine Entstehung eine Folge der Autolyse ist, muß noch geklärt werden. Wir halten das letztere für wahrscheinlich, obwohl nach Angaben von GRUBHOFER (1949) bisher niemals Wachstum ohne gleichzeitige Farbstoffbildung

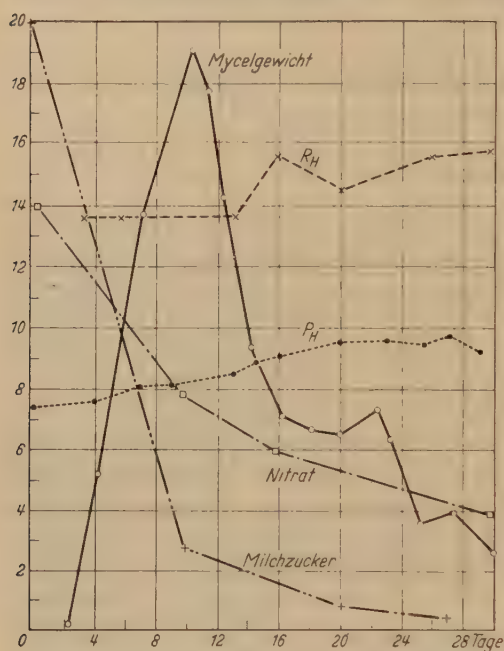


Abb. 1. Actinomyetenstamm 1a: Kultur in synthetischer Nährlösung.

- ——— ○  $\frac{1}{10}$  Mycelgewicht in mg.
- ..... ● pH.
- × ——— × rH.
- + ..... +  $\frac{1}{50}$  der Menge an Milchzucker in mg.
- ——— □  $\frac{1}{25}$  der Menge an Nitrat in mg.

beobachtet wurde<sup>1</sup>. Mit dem Einsetzen der Autolyse steigt der Ammoniakgehalt der Kulturlösung stark an, um dann nach dem 22.—24. Tag wieder abzusinken. Parallel zu dieser Kurve liegt die Kurve des entstandenen Farbstoffes. Der Aminostickstoff in der Kulturlösung ändert praktisch vom 8.—10. Tag seinen Wert nicht mehr. Das ist besonders hervorzuheben, da man eigentlich mit dem Einsetzen der Autolyse auch einen Anstieg des Aminostickstoffs erwarten sollte. Ähnlich gleichmäßig verlaufen die Kurven für den pH- und rH-Wert. Bei Beginn der Autolyse steigt durch Ammoniakbildung der pH-Wert stärker an. Daß die Reduktionskraft des wachsenden Mycels größer ist als die des autoly-

sierenden, ist verständlich. An anderen aeroben Actinomyetenstämmen durchgeführte Versuche zeigten, daß auch hier der rH-Wert fast immer in dem Bereich von + 0,01 bis + 0,11 Volt liegt. Bemerkenswert sind ferner die auch bei Wiederholung des Versuches aufgetretenen Schwankungen des Mycelgewichtes nach dem 16. Tag. Es ist anzunehmen, daß es sich hier um eine zeitweise Wiederaufnahme des Wachstums, gefolgt von erneuter, verstärkter Autolyse, handelt. Ähnliche Ergebnisse beschreiben WOODRUFF u. RUGER (1948) sowie DULANEY u.

<sup>1</sup> R. GROTHE hat in einer Dipl.-Arbeit (Göttingen 1949) diese Fragen speziell bei submerser Kultur experimentell bearbeitet.

PERLMAN (1947) an einem streptomycinbildenden Stamm von *Streptomyces griseus* in prolinhaltiger Nährlösung. Auch hier setzt die Bildung des Antibiotikums wie bei uns die des Farbstoffes erst im Verlauf autolytischer Prozesse stärker ein. Im Gegensatz dazu fanden WAKSMAN und Mitarbeiter (1946), daß sowohl bei Ruhekulturen als auch bei submersen Kulturen von *Streptomyces griseus* die maximale Streptomycinkonzentration gleichzeitig mit dem maximalen Mycelgewicht erreicht wurde. WAKSMAN verwendete dabei eine Nährlösung mit Pepton, Fleischextrakt und Glucose.

Der Stickstoffgehalt des Mycels bleibt abgesehen von einem flachen Maximum zur Zeit der beginnenden Autolyse verhältnismäßig konstant zwischen 8 und 10%. Um festzustellen, welche Aminosäuren in dem Mycel vorlagen, haben wir das Mycel mit Schwefelsäure hydrolysiert und nach entsprechender Aufarbeitung das neutrale, leicht gelblich gefärbte Hydrolysat untersucht. Mit den üblichen Farbreaktionen konnte das Vorhandensein folgender Aminosäuren wahrscheinlich gemacht werden:

Xanthoproteinreaktion positiv	}	Tyrosin
MILLONsche Reaktion „		
PAULische Reaktion „		
Alkalische Bleisalzlösung, positive Reaktion	}	Cystin
Phthaldialdehydreaktion positiv		Glykokoll

Mit Hilfe der Methode der Chromatographie an Filtrierpapier wurde außerdem das Vorkommen von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin wahrscheinlich gemacht. Ob darüber hinaus noch weitere Aminosäuren in dem Mycel, bzw. im Hydrolysat vorhanden sind, bedarf noch

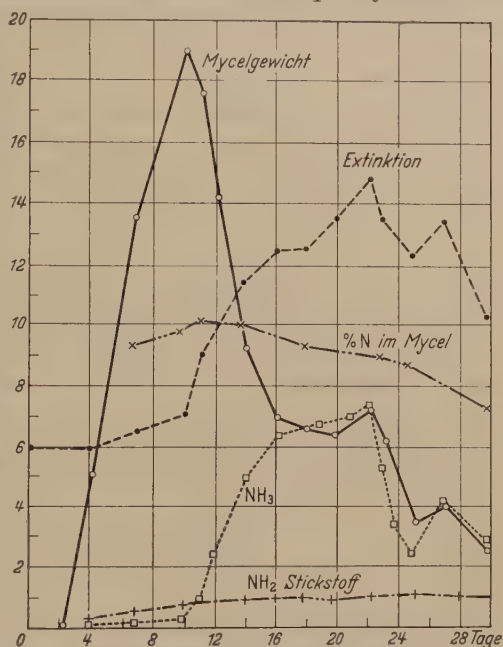


Abb. 2. Actinomycetenstamm 1a; Kultur in synthetischer Nährlösung.

- — — — — ○  $\frac{1}{10}$  Mycelgewicht in mg.  
 ● — — — — ● 50facher Wert der Extinktion bei Verwendung von FarbfILTER 2.  
 × — — — — × % N im Mycel.  
 □ — — — — □ NH<sub>3</sub>-Stickstoff in mg } in der Lösung.  
 + — — — — + NH<sub>2</sub>-Stickstoff in mg

der weiteren Bearbeitung<sup>1</sup>. Das Vorkommen der genannten Aminosäuren im Eiweiß von Mikroorganismen ist in keiner Weise überraschend. Schon ABDERHALDEN und RONA stellten im Jahre 1905 fest, daß im Mycel von *Aspergillus niger* Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll, Alanin, Tyrosin und Leucin vorhanden sind.

In einem orientierenden Vorversuch mit nur 6 Kolben wurde die Frage geprüft, ob bei Zusatz von Mycelhydrolysat zur Kulturlösung sich die

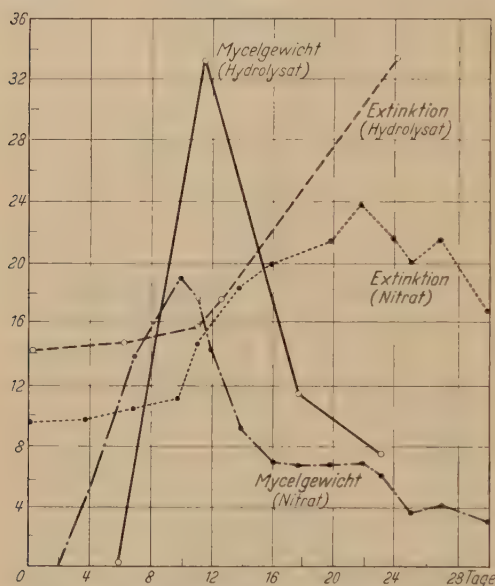


Abb. 3. Actinomyetenstamm 1a: Kultur mit und ohne Zusatz von Mycelhydrolysat.

Hydrolysatnährboden ○ — ○ Mycelgewicht in mg.  
○ - - - ○ 80fache Extinktion.  
Nitratnährboden ● - - ● Mycelgewicht in mg.  
● ····· ● 80fache Extinktion.

Auch durch Zusatz von Ammonphosphat ließ sich die anfängliche Hemmwirkung des Hydrolysat nicht aufheben.

### Versuchsteil.

Zusammensetzung der Kulturlösung (Vorschrift nach GRUBHOFER):

20 g Milchzucker, 8,5 g Natriumnitrat, 0,5 g sek. Kaliumphosphat, 0,5 g Natriumchlorid, 0,5 g Magnesiumsulfat, 0,01 g Ferrosulfat in 1 l Wasser.

Je 50 cm<sup>3</sup> dieser Lösung wurden in 200 cm<sup>3</sup> ERLÉNMEYERkolben sterilisiert und danach der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Brutraumtemperatur 24–26° C.

Zur Bestimmung des Myceltrockengewichtes wurde 3 Std bei 90° getrocknet.

<sup>1</sup> Vgl. Diplomarbeit G. GROTHE, Göttingen 1949.

Entwicklung des Stammes fördern läßt. Die Ergebnisse sind in der Abb. 3 dargestellt. Neben einer Steigerung des Mycelgewichtes auf fast das Doppelte konnte auch die Farbstoffbildung erheblich verstärkt werden. Bemerkenswert ist ferner, daß die Kulturen mit Hydrolysatzusätzen erst nach 6 Tagen sichtbares Wachstum zeigten. Daß diese Erscheinung wahrscheinlich auf eine spezifische Hemmwirkung der Aminosäuren aus dem Hydrolysat zurückzuführen ist, bewies ein Versuch mit gleichzeitigem Nitratzusatz, bei dem das Wachstum die gleiche Verzögerung wie auf dem Hydrolysatnährboden zeigte.

Bestimmung des Gesamtstickstoffes im Mycel. 20—40 mg des pulverisierten und über Phosphorpentoxyd getrockneten Mycels wurden mit 3 cm<sup>3</sup> selenhaltiger konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von etwas Kupfersulfat und Kaliumsulfat verascht. Das nach dem Versetzen mit 30% iger Natronlauge freiwerdende Ammoniak wurde im Dampfstrom abdestilliert und in n/100 Salzsäure aufgefangen. Titration mit Methylrot-Methylenblau (Indikator nach GROAK).

Die Bestimmung des  $r_H$ -Wertes erfolgte mit der von der Firma Merck in den Handel gebrachten Reihe von 12 Indikatorfarbstoffen. Diese Reihe reicht vom Neutralrot ( $-0,32$  Volt) über Methylenblau ( $+0,01$  Volt) bis zur Diphenylaminsulfonsäure ( $> +0,23$  Volt). Die Meßröhrchen (THUNBERG-Röhrchen) wurden nach der Zugabe des Indikators auf  $p_H = 7$  gebracht, evakuiert und bei 27° die Färbung bezw. Entfärbung abgelesen. Während die für die Kulturlösungen gemessenen Werte sich praktisch während des Wachstums nicht änderten, zeigten Suspensionen von mit Sand zerriebenen Mycel in Wasser im Laufe des Wachstums den in Abb. 1 dargestellten Wechsel des  $r_H$ -Wertes. Die Genauigkeit der Methode ist entsprechend den Umschlagsbereichen der Farbstoffe nicht sehr groß, reicht aber für orientierende Vorversuche aus.

Bestimmung des Aminostickstoffes in der Kulturlösung. Die vom Mycel befreite Kulturlösung wurde auf 50 cm<sup>3</sup> aufgefüllt und davon entsprechende Teile zur Bestimmung des Aminostickstoffes nach der Methode von VAN SLYKE verwendet (Mikroapparatur nach VAN SLYKE; PREGL-ROTH, Quantitative organische Mikroanalyse S. 210, 1946).

Der Ammoniakgehalt der Kulturlösung wurde durch Abdestillieren des nach Zugabe von Lauge freiwerdenden Ammoniaks und Titration analog der KJELDAHL-Methode bestimmt. Diese und alle anderen Werte sind auf 50 cm<sup>3</sup> Kulturlösung umgerechnet.

Die Bestimmung des  $p_H$ -Wertes erfolgte mit dem Ionometer von LAUTEN-SCHLÄGER unter Verwendung einer Chinhydronelektrode.

Die Bestimmung des Milchzuckers wurde durch Umsetzung mit FEHLINGscher Lösung vorgenommen.

Die Bestimmung von Nitrat. Durch Reduktion mit DEWARDAScher Legierung wurden alle Nitrationen zu Ammoniak reduziert. Das Ammoniak wurde wie üblich bestimmt. Vom erhaltenen Wert wurde die vor der Reduktion bestimmte Menge Ammoniak abgezogen.

Die Bestimmung der Farbstoffmenge. Die Extinktion der Lösung als Maß für die Menge des vorhandenen gelben Farbstoffes wurde im ZEISS-PULFRICH-Stufenphotometer mit dem Filter 2 (450 m $\mu$ ) bestimmt.

Die Papierchromatographie des Mycelhydrolysats wurde in einem Phenol-Wasser-Gemisch unter Zusatz von Ammoniak durchgeführt. Länge der Papierstreifen (WHATMAN Nr. 1) 45—50 cm, Breite 4 cm, Dauer des Chromatogramms ungefähr 20 Std, Trocknung der Streifen bei 110°, Besprühen mit 0,1% iger butanolischer Ninhydrinlösung und erneute Trocknung. Die Farbflecke wurden mit den entsprechenden Flecken aus einem Kontrollversuch verglichen und daneben die Lage des Farbfleckes im Vergleich zu der Gesamtlänge des Chromatogrammes bestimmt ( $R_F$ -Wert).

Die Zusammensetzung der Kulturlösung bei Verwendung von Hydrolysat war: 20 g Milchzucker, 16,8 g Hydrolysat — (12,1% Stickstoff), 0,5 g sek. Kaliumphosphat, 0,5 g Kochsalz, 0,5 g Magnesiumsulfat, 0,01 g Ferrosulfat in 1 l Wasser.

Herrn Prof. BROCKMANN danken wir für das der Arbeit entgegengebrachte Interesse.



### Literatur.

- ABDERHALDEN, E., u. P. RONA: Hoppe-Seylers, Z. f. physiol. Chem. **46**, 179 (1905). — CONSDEN, R., A. H. GORDON u. A. I. P. MARTIN: Biochem. J. **38**, 224 (1944). — DULANEY, E. L., u. D. PERLMAN: Bull. Torrey Botan. Club **74**, 504 (1947). — N. GRUBHOFFER: Diss. math. nat. Fak. Göttingen 1949. — PLOTHO, O. v.: Naturwiss. **34**, 190 (1947). — SCHATZ, A., S. A. WAKSMAN, u. H. C. REILLY: J. Bacter. **51**, 753 (1946). — WOODRUFF, H. B., u. M. RUGER: J. Bacter. **56**, 315 (1948).

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Dresden 1944/45  
(Direktor: Prof. Dr. FR. TOBLER).

## Zur Ernährungsphysiologie des Pilzes der *Xanthoria parietina*.

Von

INGEBORG AM ENDE, geb. SÜSS.

Mit 6 Abbildungen.

(Eingegangen am 1. September 1949.)

Die Untersuchung knüpft an die mehrfach von TOBLER zum Ausdruck gebrachte Ansicht an, daß es bei ernährungsphysiologischen Beobachtungen an Flechten wichtig ist, die Ernährungsbedingungen für Pilz und Alge getrennt zu erfassen, um das Problem ihrer Symbiose zu lösen. Daher werden hier die Nährstoffansprüche des Pilzes zu erforschen gesucht, wobei zunächst die C- und die N-Assimilation im Vordergrund stehen und hinsichtlich ihrer morphologischen Auswirkung untersucht werden. Es sollten sich hieran weitere Untersuchungen über die für die Entwicklung wichtigen Wirkstoffe anschließen, wo ebenfalls die Beeinflussung der Morphologie im Vordergrund stehen muß. Durch die gänzliche Zerstörung des Instituts wurde die Ausführung dieses Teiles der Arbeit unmöglich. Doch hat inzwischen TOBLER (1944) einen Beitrag hinsichtlich der Keimung geliefert.

### *Methodik.*

1. *Einsporenkulturen*: Ausgangsmaterial war ein kräftig unter Wasserstrahl gereinigter Thallus, aus dem ein Apothecium vorsichtig herausgelöst und auf einen Objektträger mit Glasring gebracht und in einem Flüssigkeitstropfen (Wasser oder Nährlösung) zerquetscht wurde. Aus dem entstehenden Brei wurden die Sporen mittels des Mikromanipulators isoliert und auf festen Nährboden in der üblichen Form des Hängetropfens übertragen. Die Kulturen wurden bei Zimmertemperatur in feuchten Kammern aufbewahrt. Ähnliche Versuche mit Hyphenbruchstücken hatten keinen Erfolg.

2. *Kultur von ejakulierten Sporen*: Ein Stück Flechtenthallus wurde wie bei 1. äußerlich gereinigt, dann ein einzelnes Apothecium herausgelöst und auf einen Ringobjektträger gebracht. Über dem Ring lag in Höhe von 3,5 mm das Fangdeckgläschen. Der Spannungszustand zur Ejakulation stellte sich sehr rasch ein. Übereinstimmend mit FALCK u. THOMAS und im Gegensatz zu BARTUSCH erfuhr der Ejakulationsvorgang durch überschüssige Feuchtigkeit keine Hemmung. Die feucht in dem Ring liegenden Apothecien ejakulierten nach etwa  $\frac{1}{2}$  Std. Die relativ lange Dauer bis zur Ejakulation, die BARTUSCH angibt, dürfte im Alterszustand des Apotheciums begründet sein. Bei älteren hat die Quellungsfähigkeit der Ascuswände eine Beeinträchtigung erfahren. Die gleichzeitig stattfindende Verdunstung der Flüssigkeit am Apothecium hat keinen Einfluß auf den Vorgang. Um das Ausschleudern zu großer Sporenmengen auf ein Fanggläschen zu verhindern, wurde

der Vorgang unter dem Mikroskop verfolgt und jeweils nach Ausschleudern von 1—3 Sporenhäufchen (also nach wenigen Sekunden) ein neues Fanggläschen aufgelegt. Auf diese Weise wurden Reihen von Kulturen erhalten, die einheitlicher Art waren. So waren bei einer Gesamtdauer der Ejakulation von  $\frac{3}{4}$  Std keine Unterschiede im Alter oder Reifegrad der Sporen zu berücksichtigen, die Keimkraft also als gleichmäßig anzusehen, wie sie THOMAS für den Fall längerer Ejakulation erwähnt. Indessen war diese Annahme insofern nicht ganz zutreffend, als die Keimkraft doch ungleich war innerhalb kurzer Ejakulationszeit. Eine gewisse Streuung scheint bei ernährungsphysiologischen Untersuchungen unvermeidlich. WINDISCH erblickt Ursachen dafür in der Abhängigkeit der Verhältnisse von Licht, Temperatur und Feuchtigkeit.

Immerhin gestattet eine Einsporkultur, die Keimung und das Wachstum der Sporen auf bestimmtem Nährboden genau zu verfolgen, während die Ejakulation als Ausgang oft Beeinflussung durch Infektion erfährt. Aber bakterienfreie Kulturen von Flechtenpilzen sind gewiß als etwas Ungewöhnliches zu werten, da sie in keiner Weise den natürlichen Verhältnissen entsprechen. Wenn es sich allerdings darum handelt, zunächst den Einfluß der Nährstoffe festzustellen, so ist Reinkultur unentbehrlich. Daß den Stoffwechselprodukten von Pilzen und Bakterien ein Einfluß auf die Entwicklung des Flechtenpilzes zuzuschreiben ist, ist klar. Die Keimung erfuhr in den beobachteten Fällen oft eine Förderung, während das weitere Wachstum gehemmt wurde. Das stimmt zum Teil mit den Angaben von WINDISCH überein, der in HÄGELUND-ALMSOLECHNERScher Nährlösung einerseits Keimung der *Bombardia*-Sporen nur in Gegenwart von Bakterien beobachten konnte, andererseits aber auch durch Zugabe von 0,5% Asparagin Keimungshemmungen durch Bakterien und Lufthefen feststellte. Das Maß der Fremdinfection mag für verschiedenes Verhalten der Sporen bei der Keimung Ausschlag geben. Hierzu stimmen auch die Beobachtungen von TOBLER (1944). Positive Ergebnisse hinsichtlich Wirkung von Fremdinfection erzielte FRIES bei der Keimung von *Lycoperdon*-Sporen, die nur so erfolgte. Nach ihm wirken Bakterien, Hefen und verschiedene Hyphenpilze dabei anregend. Und er konnte auch nachweisen, daß nicht ein in das Substrat diffundierender Stoff die Wirkung ausübt, sondern daß durch die Tätigkeit jener Organismen eine Eliminierung oder Neutralisierung von die Keimung hemmenden Stoffen erfolgt. Der Vorteil der Ejakulationsmethode liegt übrigens darin, daß man bei der Betrachtung einer kleinen natürlichen Einheit, eben der 8 Sporen eines Ascus, erkennen kann, ob es sich um normal entwickelte und nicht um Degenerationsformen handelt. Erwünscht wäre an sich eine Kombination der beiden Methoden (so wie sie THOMAS für seine Reinkulturen verwandte) der Art, daß man die ejakulierten Sporen mit Mikromanipulator von einander trennt und isoliert. Hierauf mußte ich aber verzichten, weil der Mikromanipulator mir später nicht mehr zur Verfügung stand.

Für eine Reihe von Versuchen über die Keimfähigkeit durch Luftbewegung verschieden weit verbreiteter Sporen benutzte ich die besonderen Kulturkölbchen für Flechten wie sie TOBLER (im Anschluß an MÖLLER u. ZOPF) vielfach verwendet hat.

Mein Flechtenmaterial stammte teils aus der Umgebung von Göttingen, teils vom Boden- und Starnberger See, von Fanoe und aus Westpreußen. Unterlagen waren dabei verschiedene: Obstbäume, Weiden, Platanen, totes Holz, Mauern, Eisenbahngeländer. Unterschiede wurden aber nicht bemerkt, die Unabhängigkeit von der Unterlage ist offenbar weitgehend vorhanden.

Die Aufbewahrung des Flechtenmaterials geschah unter Glasglocken am Fenster bei etwa 18° C und geringer Luftfeuchtigkeit. Zur Vermeidung von Verpilzung wurde ein Schälchen mit Nelkenöl beigegeben. Bei zeitweiligem Befeuchten hielten sich die Thalli längere Zeit frisch.

## Die Nährstoffansprüche.

### *I. Kohlenstoff-Assimilation.*

Die verschiedenen Mineralsalze wurden dem Nährboden zugesetzt, um das den Pilzen Nötige zu bieten. Die Wahl der Verbindungen für die Deckung des Bedarfs an C und N geschah mit Rücksicht auf die Stoffwechselprodukte der Algen, die für den Pilz in Frage kamen. Als solche kamen in Betracht: Glykogen, Erythrit, Stärke, Inulin, Mannit, Glucose und Fructose. Daß auch andere Stoffe verwendet wurden, geschah in der Annahme, daß in der Symbiose beide Partner nicht unter optimalen Verbindungen leben, was die Untersuchungen von THOMAS bewiesen haben. Es kann durchaus günstige Nährstoffquellen geben, die im natürlichen Stoffwechsel der Flechte nicht auftreten.

Die C-Ansprüche des Flechtenpilzes wurden zunächst an Einsporkulturen untersucht. Neben Bierwürze-Agar kamen, der Fragestellung dieses Kapitels entsprechend, nur genau definierte Substrate zur Anwendung.

Nährlösung A: in 100 cm<sup>3</sup> aqua destillata 0,1 g Asparagin, 0,05g MgHPO<sub>4</sub>, 0,15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g C-Quelle, 1,5 g Agar.

In den Einsporkulturen wurden zunächst nur Erythrit und Pectin als C-Quellen geprüft. Die Lösung kam in der angegebenen Konzentration und 1—10facher Verdünnung zur Anwendung. Von der Bierwürze wurden Verdünnungen 1 : 50, 1 : 500 und 1 : 1000 mit 1,5% Agar verwendet.

Nährlösung B: in 100 cm<sup>3</sup> aqua destillata 0,02 g Pepton, 0,02 g Liebig's Fleischextrakt, 0,06 g Glycerin, 1,5 g Agar. Die Nährlösung B wurde außerdem noch in 2- und in 10facher Verdünnung verwendet.

Die Beobachtungen über Sporenkeimung und Wachstum auf den verschiedenen Böden ergaben folgendes:

Erythrit und Pectin haben günstigen Einfluß auf die Entwicklung des Pilzes. Sporen keimten meist am 1. oder 2. Tage nach der Isolierung, z. T. bipolar, z. T. unipolar. MÖLLERS Beobachtung, daß bei dem Pilz von *Lecanora subfusca* bipolare Keimung in Nährlösung, unipolare in Wasser vorherrsche, war für den Pilz von *Xanthoria* nicht zutreffend. Oft keimten beide Sporenzellen gleichzeitig und gleichmäßig aus, später konnte das Erzeugnis einer Seite zurückbleiben. Es kam auch vor, daß zunächst nur die eine Zelle keimte, aus ihr aber nach einigen Tagen noch ein zweiter Keimschlauch entsproßte, der den ersten aufholte und sich verzweigte. Nach weiteren Tagen keimte auch die zweite Zelle. Keimung nur aus einer Zelle war selten. Nur in seltenen Fällen kamen Hyphen an beliebigen Stellen der Spore hervor oder zwei Keimschläuche aus einer Zelle. Es konnte wohl auch bei ungleichzeitiger Keimung das Mycel der später gekeimten Zelle sich besser entwickeln. Ganz allgemein bestand der Eindruck, daß nach einmal erfolgter Keimung die nachträglich



gebildeten Hyphen zu lebhafterem Wachstum angeregt wurden. Die Verzweigungen waren meist ersten und zweiten, selten dritten Grades. Die Wirkung des Pectinagars von 0,5% entsprach der des 0,05%igen Erythrits. Auftreten der ersten Verzweigung erfolgte bei Erythrit 0,5% nach 5—6 Tagen, bei 0,05% nach 4 Tagen und bei Pectin 0,5% nach 5 Tagen. Unterschiede in der Art der Verzweigung waren nicht zu beobachten, der Wuchs aber war auf Erythrit gedrungener als auf Pectin. Bei Bierwürzeagar hatte die geringste Konzentration (Verdünnung 1:1000) keine Wirkung, nur wenige Sporen keimten, ihre Entwicklung blieb gering. Es fiel dabei auf, daß bei manchen Sporen die Membran nach einiger Zeit platzte und der ölig-körnige Inhalt austrat, oder daß nach Keimung der einen Zelle die andere glasig wurde und platzte. Der Grund hierfür ist, wie sich später ergab, geschwächte Keimkraft, die nicht in äußerer Deformierung erkennbar wird. Von den weiteren Bierwürzekonzentrationen hatte 1:500 günstigere Wirkung, verschiedene Wuchsformen traten nicht auf. Bei 1:500 erfolgte Keimung am zweiten, bei 1:50 am dritten Tage. Verzweigung stellte sich am 4. oder 5. Tage und bei 1:50 (wenn überhaupt) am 6. Tage ein. Der Würzeverdünnung von 1:500 entsprach eine Maltosekonzentration von etwa 0,07%. Verglichen mit Erythrit und Pectin war Bierwürze weniger gut.

Glycerinnährboden hatte in allen drei Konzentrationen gleich guten Erfolg. Keimung am 1. oder 2. Tage, Verzweigung meist am 4. Tage. Unterschiede in der Mycelbildung traten nicht auf. Hinsichtlich der Entwicklung des Pilzes kam der Glycerinnährboden dem mit Erythrit und Pectin gleich.

Es wurden insgesamt 118 Sporen isoliert, von denen 83 keimten. Eine Anzahl wurde nach etwa 14 Tagen, sofern sie keinerlei Infektion zeigten, auf Schrägagar des entsprechenden Nährbodens übertragen und für Reinkulturen aufbewahrt. Nach 3 Monaten hatte ein Teil davon Größen von 0,5—1 mm Durchmesser erreicht, das Mycel bildete ein zartes, gelblichweißes Köpfchen auf der Oberfläche des Agars oder z. T. in ihm (je nach Führung der Impfnadel). Hier wiesen im Gegensatz zu dem für die Mikrokulturen Angegebenen die auf Bierwürzeagar recht gutes Wachstum auf. Man kann vermuten, daß die Wirkung eines Substrates vom Alter des Flechtenpilzes abhängt. Nach weiteren 7 Monaten zeigten diese Kulturen verschiedenartiges Aussehen. Teilweise waren stecknadelkopfgroße Gebilde von gelblicher bis rötlicher Farbe entstanden, von denen weißes Mycel ins Substrat ausstrahlte. In einer Kultur bildete der Thallus einen fast dunkelbraunen, kompakten Klumpen auf der Substratoberfläche, von dem kein fädiges Mycel hineinging. Bei dieser Form trat auch schwache Rotfärbung des Nährbodens auf (vielleicht Bildung einer Flechtensäure).

Zwecks Erlangung eines allgemeineren Überblickes über die Ergebnisse der Einsporkulturen und Berücksichtigung der oben erwähnten

Streuungen wurden auch zahlreiche Sporen gleichzeitig im Hängetropfen beobachtet. Ein Vergleich der Sporenqualität aus verschiedenen Apothecien ergab, daß solche aus 0,5—1 mm großen Apothecien die günstigste Entwicklung zeigten. Diese Beobachtung steht nicht unmittelbar im Gegensatz zu der Angabe von RÄMSCH, wonach der Keimungsprozentsatz am größten sein soll bei den Apothecien, die noch knospenförmig geschlossen sind. Die aus diesen stammenden Sporen besitzen wohl den zur Keimung nötigen Reifegrad, sind aber für eine günstige Weiterentwicklung noch zu jung. Entsprechend dem reichlichen Feuchtigkeitsgrad entwickelten sich die Kulturen in Hängetropfen recht gut. Bei dem Agarnährboden war die Gefahr des Wasserverlustes während der Ejakulationsdauer größer. Ein geringerer Agargehalt als 1,5% ließ keinen Einfluß erkennen. Diese Beobachtungen stehen nicht im Einklang mit den Angaben von THOMAS und der bei ihm zitierten Literatur, seine Kulturversuche in flüssigen Medien verliefen sämtlich negativ, nach meiner Erfahrung waren solche wohl geeignet.

Als C-Quellen wurden dem Pilz geboten:

Pectin,	Glucose,	Mannit,	Aesculin,
Saccharose,	Lactose,	Inosit,	Amygdalin,
Maltose,	Glycerin,	Glykol,	Salicin.
Lävulose,	Erythrit,	lösl. Stärke,	

Die Konzentration der im weiteren Verlauf geprüften Substrate wurde etwas geringer gewählt.

Nährlösung C: in 100 cm<sup>3</sup> aqua destillata 0,05 g N-Quelle, 0,025 g MgHPO<sub>4</sub>, 0,07 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 g C-Quelle.

Am 1. Tag nach der Ejakulation zeigten die Erythrit- und Pectinkulturen, in einem Falle auch die Kontrollen, Anfangsstadien der Keimung, diese auch hier nicht einheitlich ein- oder zweiseitig. Pilze in Pectin-, Erythrit- und Maltoselösung hatten während der ersten Tage eine außerordentlich gute Entwicklung, die aber nicht immer so blieb. Namentlich die Erythritkulturen wuchsen anfangs am schnellsten, ließen dann aber gegenüber den anderen nach.

Vergleich des Wachstums auf verschiedenen Substraten. Nach der Keimung traten bis zum 4. oder 5. Tag keine habituellen Unterschiede auf. Nach 5 Tagen waren erhebliche Größenunterschiede bemerkbar. Das beste Wachstum hatten stets die Pectinkulturen, fast ebenso gut erwiesen sich Glucose und Maltose. Glykol und Inosit wirkten wachstumshemmend. Es ist möglich, daß hieran die Konzentrationen schuld sind. Ihr etwaiger Einfluß wird später behandelt. Einige Zahlen mögen die Wachstumsmasse nach 8 tägiger Kultur belegen:

Durchschnittsgröße bei	Pectin	104,9 $\mu$	Kontrolle	58,7 $\mu$
	Glucose	90,4 $\mu$	Glykol	36,6 $\mu$
	Maltose	83,2 $\mu$		

In diesen Durchschnittswerten ist die Länge der Sporen ( $20-25 \mu$ ) mitenthalten. Die Beobachtung von Keimung und weiterem Entwicklungsverlauf legen die Vermutung nahe, daß die Keimlinge erst nach 4—5 Tagen die C-Quelle in Anspruch nehmen, daß diese also auf die ersten Stadien keinen Einfluß hat. Es erscheint daher richtig, auf Fragen, die sich im Zusammenhang damit ergeben, hier etwas näher einzugehen. Zuerst berührten sie UBER und GODDARD, sodann ging WINDISCH mit der Untersuchung des Einflusses organischer Säuren auf die Sporenkeimung von *Bombardia lunata* in biologischer Hinsicht weiter. Auch TOBLER äußert mehrfach, daß Keimung und Entwicklung besser zu trennen wären. WINDISCH trennt die Keimung als einmaliges Ge-

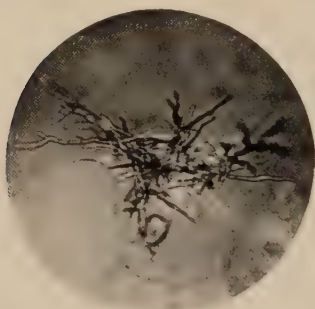


Abb. 1.



Abb. 2.

Abb. 1. Pilz ohne C-Quelle (Kontrolle), 18 Tage alte Kultur. Vergr. 140  $\times$ .

Abb. 2. Pilz mit 0,25% Pectin, 18 Tage alte Kultur. Vergr. 200  $\times$ .

schehen scharf vom Wachstum. Die Keimung ist physikalisch bedingt, unabhängig von chemischen Einflüssen. Daher ist die Keimung hinsichtlich der Nährstoffe nur vom Vorrat in den Sporen gewährleistet, das Nährmedium spielt keine Rolle. Hierzu passen meine obigen Angaben recht gut.

Neben dem Tempo und Grad des Wachstums beanspruchte aber die Wuchsform der Mycelien besonderes Interesse. Um darin Unterschiede verzeichnen zu können, war eine Kulturdauer von wenigstens 9 Tagen erforderlich. Auch darin spricht sich aus, daß die Keimlinge erst nach 4—5 Tagen die C-Quelle in Anspruch nehmen, so daß erst dann Unterschiede bemerkbar werden. Die N-Quelle blieb bei allen die gleiche (Asparagin).

Kontrollkulturen (ohne C) zeigen schlanke, geschwungene Wuchsform (Abb. 1). Die Hyphen (mit nur undeutlicher Septierung) zeigen fast



gleichmäßige Dicke. Basal- und Spitzenzellen sind kaum unterschieden darin. Nach 9tägiger Kultur treten Verzweigungen ersten und zweiten Grades auf. Die Sporenzellen haben dann noch reichlichen Inhalt.

Pectinkulturen (Abb. 2) wiesen den schon bei den Einzell-Kulturen erwähnten schlanken, bäumchenförmigen Wuchs auf. Einseitige Keimung ist bevorzugt. Sporen und die etwas angeschwollenen basalen Hyphenzellen haben ölig-körnigen Inhalt. Verzweigung reichlicher als bei den Kontrollen.

Glucosekulturen haben starke Quellung der Sporen: ihr Inhalt ist, ebenso wie der der Hyphenzellen, reicher an Fett- und Öltröpfchen. Die Gestalt der Zellen ist — nicht nur basal — oft tonnenförmig.

Maltosekulturen (Abb. 3) ähneln im Wuchs den Kontrollen und zum Teil auch den Glycerinkulturen: Die Hyphen sind schlank und geschwungen, die Septierung ist undeutlich.

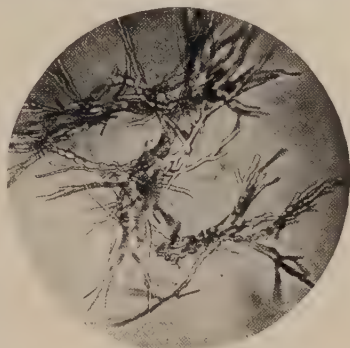


Abb. 3. Pilz mit 0,25 % Maltose, 18 Tage alte Kultur. Vergr. 200 ×.

Gänzlich anders sind die Saccharosekulturen. Die Sporen sind stark geschwollen, zum Teil zerplatzt und der Inhalt ausgetreten. Die Form der Hyphenzellen ist kugelig-oval (ähnlich bei THOMAS und Überernährung mit 4%igem Malzagar). Man muß daraus nicht (wie es THOMAS tat) auf Aufnahme von Nährstoff durch die Sporen schließen, da die Saccharosekonzentration (0,25%) doch recht gering ist. TOBLER hat darauf hingewiesen, daß allgemein doch nur sehr geringe Konzentrationen für ein dem natürlichen entsprechendes Wachstum in Frage kommen können. Es wurden im Hinblick hierauf verschiedene Konzentrationen von Saccharose geprüft: 0,25%, 1% und 4%. Schon bei 1% traten außergewöhnliche große kugelige Zellen auf, ihr Durchmesser betrug  $9,4\mu$ , während normal die Pilzhyphe  $4,5\mu$  hat. Bei geringen Unterschieden schwacher Konzentration (z. B. 0,25 und 0,5%) waren keine Unterschiede bemerkbar; wo solche etwa vorlagen, hatte die höhere Konzentration hemmenden Einfluß und erzeugte gedrungenere Form. Nun hat auch WINDISCH bei *Bombardia lunata* durch Zusatz von Weinsäure (0,075 und 0,067%) Keimblasen von 4—5facher Größe erzielt, die er als Nährstoffwirkung der Säure anspricht, ohne aber die Möglichkeit einer Bedeutung des pH-Wertes auszuschließen. Bei meinen Untersuchungen lag ein solcher Einfluß des pH-Wertes niemals vor. Die pH-Messungen wurden mit dem Lautenschlägerschen Ionometer ausgeführt und ergaben:



Glycerin .....	6,15,	Maltose .....	5,89,
Glucose .....	6,54,	Inosit .....	6,26,
Lävulose .....	5,14,	Glykol .....	5,96,
Saccharose .....	6,18,	Erythrit .....	6,18,
Pectin .....	4,80,	Kontrolle .....	6,06.

Man sieht, daß Glycerin und Inosit etwa gleichen  $p_H$ -Wert haben, aber völlig verschiedene Bilder der Entwicklung ergeben! Außerdem wurde auch noch die Wirksamkeit einer C-Quelle, des Pectins, mit variiertem  $p_H$ -Wert geprüft: es konnten keine habituellen Unterschiede beobachtet werden. Bei Saccharose aber ergab sich mit dem  $p_H$ -Wert ein Unterschied, es fehlte der gedrungene Wuchs. Möglicherweise wird hier bei verändertem  $p_H$  die Aufnahmefähigkeit der Zellen für die C-Quelle herabgesetzt. In Übereinstimmung mit THOMAS befinde ich mich hinsichtlich der Annahme, daß ein optimales  $p_H$ -Bereich für unseren Pilz bei 5,2 bis 6,4 liegt. Dementsprechend wurden die Nährlösungen, deren  $p_H$ -Wert außerhalb davon lag, mit KOH auf 6,2 (Bromthymolblau) eingestellt.

Lävulosekulturen ähnelten den Saccharosekulturen, aber Quellung und Deformierung der Sporen war weniger auffällig.

Glycerinkulturen wiederum ähnelten denen von Maltose und den Kontrollen. In einzelnen Fällen aber war ein völlig anderer Verzweigungstyp zu sehen: der Wuchs war auffallend gedungen und sparrig. Bemerkenswert war hier stets die Dichte des Mycels.

Weniger günstig als nach den Einsporenkulturen zu erwarten, fielen die Erythritkulturen aus. Der Wuchs des Mycels war gedungen, kuglige Aufquellung vieler Zellen häufig. Hyphen und Sporen hatten wenig Inhalt, die reiche Verzweigung blieb aus.

Glykol und Inosit wirkten in frühen Stadien wachstumshemmend, daher war keine bestimmte Wuchsform bemerkbar. Lactose und lösliche Stärke ergaben Formen ähnlich den Kontrollen, nur daß das Mycel reicher und dichter ausfiel. Mannitkulturen ähnelten denen mit Saccharose, doch war das Wachstum rascher.

Die Glucoside Amygdalin und Salicin stellten gut ausnutzbare C-Quellen vor, während Aesculin nur anfangs gute Entwicklung zeitigte, auf die dann Stockung des Wachstums folgte. Das Mycel auf Amygdalin zeichnete sich durch zahlreiche kurze Seitenästchen, von der Basis bis zur Spitze ansitzend, aus, auf Salicin waren sie etwas weniger zahlreich. Mit dem gedungenen Aussehen ähnelten die Kulturen auf beiden Böden denen auf Pectin. Anastomosen wurden nicht bemerkt.

Endlich wurden systematisch noch als C-Quellen in Betracht gezogen: Bernsteinsäure, Citronensäure, Acetylsalicylsäure, Salicylsäure, Saligenin, Apfelsäure, Tannin und Glykogen. Bei allen wurde die Nährlösung mit 2n KOH auf  $p_H$  6,2 eingestellt. Acetylsalicylsäure und Tannin unterdrückten die Keimung völlig. Saligenin hemmte sie deutlich,

Salicylsäure wirkte hemmend auf das Längenwachstum, während die Verzweigung relativ reich war. Bernsteinsäure, Citronensäure und Glykogen waren gut verwertbar. Äpfelsäure übertraf sogar in der Wirkung das Pectin. Alle Wuchsformen gehörten dem Typ derer vom Pectin an.

Wechselkulturen. Bei Kultur im Hängetropfen war nach 20- bis 25tägiger Dauer eine Verlangsamung des Wachstums zu bemerken. Daher mußte neue Nährlösung zugesetzt werden. Dies geschah teils in der gleichen Art der Lösung wie vorher, teils unter Wechsel derselben. Wäh-

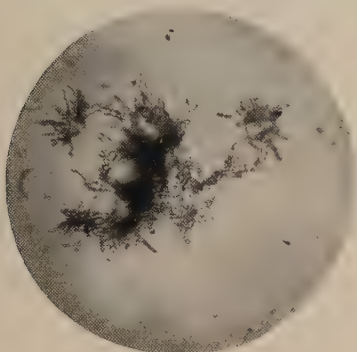


Abb. 4a.

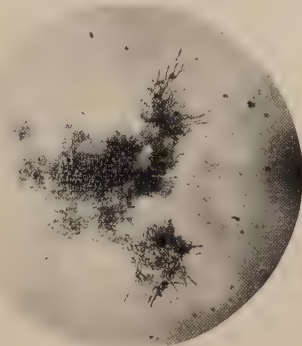


Abb. 4b.

Abb. 4a. Pilz mit Saccharose, 21 Tage alte Kultur. b. Die gleiche Kultur wie Abb. 5 nach Übertragung in Pectinnährlösung und 8 Tagen. Vergr. 100  $\times$ .

rend bei den ersteren wieder normales Wachstum einsetzte, ergaben sich bei den Wechselkulturen interessante Veränderungen. Die Kontrollen blieben übrigens weiterhin deutlich zurück, selbst bei neu zugefügter Lösung. In 26 Tagen war der Sporenhalt hyalin kontrahiert, zum Teil völlig aufgebraucht. Das Mycel blieb schwach (Hyphendicke nur etwa 2,4  $\mu$ ).

Bei den Pectinkulturen trat bei Erneuerung des Mediums lebhaftes Wachstum ein, was sich in reicherer Verzweigung kundtat, während die Sporen deformiert wurden; offenbar war ihre Funktion bei Erreichung einer gewissen Mycelgröße erschöpft.

Auch die Glycerinkulturen zeigten erneut lebhaftes Wachstum, aber die neugebildeten Hyphen waren kurzgliedrig, jetzt auch die seitlichen (vielleicht Folge einer Substraterschöpfung durch *Penicillium*-Infektionen?). Immerhin blieben die Glycerinkulturen durch ihr ausgesprochen dichtes, knäuliges Wachstum charakterisiert.

Bei den Glucosekulturen erfuhren die Sporen starke Deformierung, das neue Wachstum begann später, war aber dann lebhaft. Groß waren die Dickenunterschiede der Hyphen: basal etwa 8,4  $\mu$  und an der Spitze 2,4  $\mu$ .

Wie sehr die C-Quelle die Wuchsform bestimmt, erwiesen aber vor allem die Wechselkulturen. Kontrollen, Pectin-, Glycerin- und Maltosekulturen wurden in solche mit Saccharose übertragen, andere aus

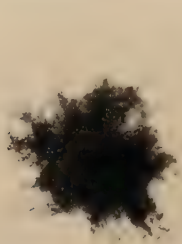


Abb. 5a.

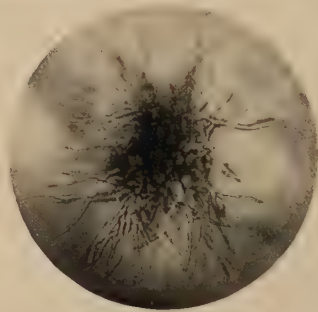


Abb. 5b.

Abb. 5. Zwei gleichmäßig gut entwickelte 22 Tage alte Kulturen mit Glycerin, denen im einen Falle (a) Saccharose, im andern (b) Pectinnährlösung zugesetzt worden war. Beide sind 36 Tage alt. Vergr. 200  $\times$ .

Saccharose-, Glycerin- und Lävuloselösung in Pectinlösung. Der Substratwechsel erfolgte nach 21 Tagen. Bereits am 2. Tage war der Zuwachs des Hyphen in Pectinlösung deutlich in seiner schlanken Form von dem

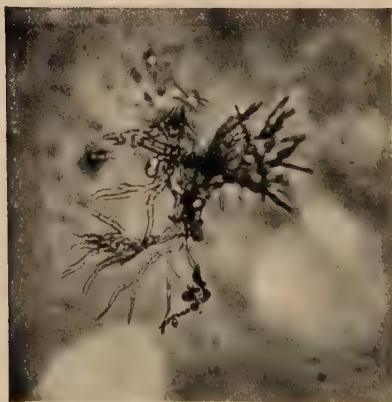


Abb. 6a.

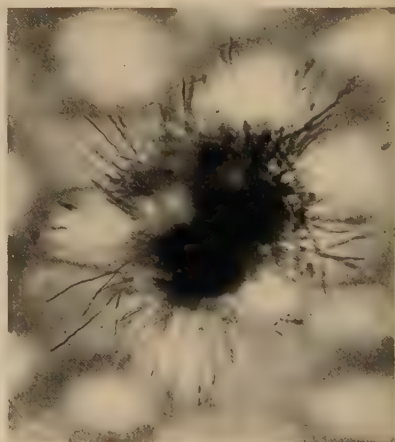


Abb. 6b.

Abb. 6a. Pilzkultur mit Lävulose 18 Tage alt.

Abb. 6b. Die gleiche Kultur wie a nach Übertragung in Pectinnährlösung und weiteren 18 Tagen. Vergr. 200  $\times$ .

auf Saccharose mit der gedrungenen unterschieden. Das alte Mycel erfuhr dabei keine Veränderung (Abb. 4a u. b). Umgekehrt zeigten von Pectin auf Saccharose übertragene Mycelien nach 2 Tagen ebenfalls Anfang

von Habitusänderung und nach 7 Tagen war die gedrungene Wuchsform mit tonnenförmigen Zellen ganz deutlich. Auch die Kulturen von Maltose nahmen auf Saccharose die für diese bezeichnende Form an. Die auf Saccharose übertragenen Kontrollen erhielten ebenfalls ovale bis runde Zellformen, doch war das Wachstum nicht sehr viel stärker als vorher. Die teils auf Pectin-, teils auf Saccharoseböden übertragenen Glycerinkulturen nahmen völlig verschiedene und bezeichnende Entwicklung an (Abb. 5a u. b). Sehr groß war die Wachstumsbeschleunigung der Lävulosekulturen nach Übertragung auf Pectinlösungen (Abb. 6a u. b).

Es lag nahe zu fragen, welche der beiden C-Quellen, Pectin und Saccharose, die beide starken Gegensatz im Habitus bedingen, nun vom Pilz am meisten bevorzugt wird. Aber die Beantwortung wurde durch den unfreiwilligen Abbruch der Versuche verhindert. Doch wurde noch durch Verwendung einer Lösung, die neben 0,05% Asparagin 0,25% Pectin und 0,25% Saccharose enthielt, festgestellt, daß die allgemeine Wuchsform durch das Pectin, die Zellform im einzelnen aber durch die Saccharose bestimmt wird (Mycel deutlich septiert, Zellform oval).

## II. Stickstoff-Assimilation.

Nachdem bei den bisher ausgeführten Untersuchungen über C-Assimilation nur Asparagin als N-Quelle gedient hatte, wobei es sich zweifellos als gute Deckung des N-Bedarfs erwies, wurden nun andere N-Verbindungen statt Asparagin geprüft. Nämlich:

$\text{NH}_4\text{Cl}$ ,	$\text{KNO}_3$ ,	$\text{NH}_4\text{OH}$ ,	Pepton (Witte),
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,	$\text{NH}_4$ -tartrat (neutr.)	Diphenylamin,	Glykokoll,
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,	$\text{NH}_4$ -oxalat,	Harnstoff,	Tyrosin.
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,	$\text{NH}_4$ -acetat,	Gelatine,	

Als Konzentration wurde 0,05% genommen, nur bei Tyrosin 0,01%. Die Versuchsdauer war 20 Tage. Nachdem sich bisher Pectin als günstige C-Quelle erwiesen hatte, wurde es nun in Verbindung mit den N-Quellen gewählt. Bei allen pectinhaltigen Nährböden trat stets die schlanke, fädige Wuchsform des Mycels auf. Offenbar ist die Wuchsform also, wie schon erwähnt, gerade von der C-Quelle abhängig, vielleicht in einzelnen Fällen auch vom pH-Wert, oder wie CZAPEK es ausdrückt: es üben einige der C-Quellen eine verhältnismäßig starke Reizwirkung aus, die mit auffälligen formativen Veränderungen verbunden sind. Für ähnliche Beobachtungen sei verwiesen z. B. auf BREFELD, der bei *Mucor mucedo* auf citronensäurehaltigem Substrat Bildung kugeliger Zellen fand, ferner auf RACIBORSKI, der bei *Basidiobolus ranarum* kugelige Zellen in konzentrierter Nährlösung erhielt, während SCHOSTAKOWITSCH bei *Dematium pullulans* in konzentrierter Zuckerlösung ein fädiges Mycel erzielte. Andererseits aber gibt RACIBORSKI an, daß gerade bei konstanter



C-Quelle und variierten N-Quellen gestaltliche Veränderungen erhalten werden können, was im Gegensatz zu meinen Beobachtungen steht.

Die N-freien Kontrollen waren im Unterschied von den C-freien durch recht gutes Wachstum ausgezeichnet, es übertraf sogar nach 16 Tagen das der Kulturen auf Harnstoff, Ammonsulfat und Ammontartrat. Diese holten allerdings später im Wachstum auf. Man könnte hieraus folgern, daß der Pilz seinen N-Bedarf erst in einem späteren Entwicklungsstadium aus dem Substrat zu decken beginnt als den C-Bedarf. Es dürfte der Gehalt an N-freien Substanzen im Sporennährmaterial relativ groß sein, weshalb das Wachstum anfangs gleichartig läuft.

Die Kontrollen hatten nach 2 Tagen gut gekeimt, nach 4 Tagen begann Verzweigung. Unter den ejakulierten Sporen waren reichlich Degenerationsformen, die erst nach 8 Tagen keimten mit starker Aufquellung und kurzgliedrigem Keimmycel. Die Weiterentwicklung war gering. Ähnlich wie RÄMSCH beobachtete ich verschiedene Formen und Stufen der Degeneration, so häufig kleine, rundliche Sporen (Sporenreste?), manchmal mit nur einer Zelle, die zweite nur angedeutet. Damit ging öfter Reduktion der Sporenzahl Hand in Hand, doch mußte keineswegs die Gesamtheit der Sporen aus einem Ascus degeneriert sein. Lauter degenerierte aus einem Ascus habe ich nicht gesehen.

Bei normalem Sporenmaterial war der Sporenzustand während der gesamten Kulturdauer unverändert. Nach 12 Tagen besaßen die Sporen wie die basalen Hyphen meist noch reichlichen Inhalt. Gegen Ende der Versuchsdauer war der Inhalt fast aufgebraucht, ebenso in den Hyphen. Es erschienen viele kurz gedrungene Seitenäste, was vielleicht beginnende Erschöpfung des Nährmaterials bedeutet. Die Ästchen sahen beginnender Conidienfruktifikation ähnlich, doch veränderten sie sich während 3 Monaten nicht.

Im Gegensatz zu THOMAS, der Anastomosenbildung gerade bei mangelhafter Ernährung beobachtet hat, wurden solche hier nur bei gut wachsenden Kulturen gefunden. Bei gedrungener Wuchsform (z. B. bei Saccharose) erschienen sie nicht, wohl aber bei den raschwüchsigen. Anastomosenbildung und Hyphendicke scheinen in gewisser Beziehung zueinander zu stehen. Zwischen Hyphen von 2—3,6  $\mu$  Stärke gab es häufig Anastomosen, zwischen dickeren niemals. Auch die Wuchsform hat einen Einfluß: niemals gab es Zellfusionen zwischen Hyphen, die gradlinig radial in das Substrat wuchsen, wohl aber bei geschlängeltem Wuchs, wobei aber die räumliche Entfernung der Hyphen von einander keine Rolle spielte. Übrigens erfolgte die Fusion sowohl zwischen Hyphen verschiedener Individuen wie zwischen solchen eines Mycels. Mehrfaches Fusionieren und enges Verschlingen, auch der Hyphenenden, wurde häufig gesehen. Primäre Abhängigkeit von der Ernährung darf wohl als

Grund für die Fusionen angenommen werden, doch wurde diese Frage nicht weiter verfolgt.

Die Kulturen mit Ammonchlorid und Ammoncarbonat wuchsen im allgemeinen besser als die Kontrollen, hatten dichteres Mycel und (seltener) Anastomosen. Auf Ammoncarbonat waren einseitig gekeimte Sporen häufig, ihr Inhalt war grobkörniger als bei den anderen. Bei den dicken Hyphen fiel die sehr deutliche Septierung auf. Sonst waren die Querwände bei schlanken Hyphen selbst mit stärkster Vergrößerung kaum sichtbar. Fremdinfectionen wurden erfolgreich vermieden. Wo Bakterien auftraten, wirkten sie häufig wachstumsfördernd.

In den Ammonnitratkulturen waren die Sporen vielfach ähnlich wie in denen mit Saccharose gequollen, viele Sporen geplatzt und der Inhalt ausgetreten. Bei einigen folgte auf anfangs spärliches Wachstum später lebhafteres; anscheinend ist die Nutzbarkeit dieser N-Quelle für verschiedene Entwicklungsstadien verschieden.

Recht unterschiedlich waren die Kulturen mit Ammonsulfat. Das Wachstum war im allgemeinen gut, zum Teil besser als in den Kontrollen. Anastomosen traten bisweilen auf, waren aber in ihrer Art verschieden: zum Teil kurzgliederig, zum Teil lang.

Ammonoxalat hatte wenig Einfluß auf die Wuchsform: die Zellen waren meist gestreckt, doch der Gesamtwuchs etwas gedrungener, gegen Ende der Kultur war oft noch reichlich Inhalt ölig-körniger Art in allen Zellen vorhanden. Ammontartrat ergab ganz ähnliches. Wieder ließ sich sagen, daß die Wuchsform wesentlich durch die Art der C-Quelle bestimmt wird.

Kaliumnitrat wurde ohne besondere Kennzeichen offenbar gut assimiliert. Auch Harnstoff verhielt sich so, einige Kulturen waren besser gewachsen als die Kontrollen. Bei ihnen traten als Folge des geschlängelten Mycels häufig Anastomosen auf.

Hydroxylamin scheint toxisch zu wirken. In keiner Kultur wurden auch nur Anfänge der Entwicklung gesehen. Da dieser Stoff auch in Verbindung mit anderen C-Quellen unverwendbar blieb, wurde er nicht mehr geprüft.

Eine Sonderstellung nahm als N-Quelle Diphenylamin ein. In einigen Fällen verhielt es sich wie Hydroxylamin, in anderen aber führte es zu recht gutem Wachstum. Es wird daher angenommen, daß es — mindestens anfangs — eine gewisse schädigende Wirkung auszuüben vermag, dann aber — nach deren Überwindung, eventuell einer Anpassung des Pilzes an den Stoff — gut als N-Quelle verwertet werden kann. Das Mycel war außerordentlich gleichmäßig gewachsen, reich verzweigt, die basalen Zellen in der Form den Spitzen gleich. Da Diphenylamin in Wasser schwer löslich ist, so ist nicht ausgeschlossen, daß in einigen Fällen sich mehr, in anderen weniger davon gelöst hatte, daß also

die Konzentrationen verschieden waren, von denen einzelne günstiger wirkten. Vielleicht ist auch der optimale Ausnutzungsbereich sehr eng begrenzt. Wegen des ungleichen Ausfalls der Versuche wurden hier verschiedene Konzentrationen geprüft: 0,005%, 0,01% und 0,05%. Aber auch dabei wurden keine klaren Ergebnisse erzielt, teilweise waren die Entwicklungen ohne Unterschied der Konzentrationen gut, teilweise unterblieben sie gänzlich.

Die Kontrollen sowie die Kulturen mit Harnstoff, Ammontartrat, Ammonsulfat und Diphenylamin wurden über 2 Monate fortgeführt. Außer auf dem letzteren trat die Verarmung überall deutlich hervor. Daß Diphenylamin diese Sonderstellung einnahm, läßt die Vermutung aufkommen, daß es sich zwar um eine schwer angreifbare Substanz handelt, daß diese aber zusätzlich auch als C-Quelle ausgenutzt wird. Gegenüber den Kontrollen und den Kulturen mit Ammonsulfat ergaben die mit Ammontartrat und Kaliumnitrat weniger deutliche Erschöpfung in der genannten Zeit. Auch hier dürfte der zusätzliche Gehalt des Anions Ursache sein. Die Längen der Hyphenzellen waren bei Ammontartrat, Diphenylamin, Kaliumnitrat und Harnstoff an der Basis größer, bei den Kontrollen und Ammonsulfat waren es die apikalen. Eine Übersicht erläutert das noch weiter:

N-Quelle	Zellenlänge Basis	Zellenlänge Spitze
Kontrollen .....	9,6 $\mu$	10,5 $\mu$
Ammontartrat .....	12,7 $\mu$	10,3 $\mu$
Kaliumnitrat .....	11,0 $\mu$	9,8 $\mu$
Diphenylamin .....	9,4 $\mu$	7,9 $\mu$
Harnstoff .....	12,5 $\mu$	12,0 $\mu$
Ammonsulfat .....	8,4 $\mu$	9,4 $\mu$

Die Zelldicke betrug an der Spitze meist 2,4  $\mu$ , an der Basis bei Ammontartrat, Ammonsulfat und Kaliumnitrat 4,1 bis 4,6  $\mu$ . Bei den Kontrollen Diphenylamin und Harnstoff waren Abweichungen zwischen Basis und Spitze gering.

Glykokoll stellte in Verbindung mit Pectin als C-Quelle keine gut ausnutzbare N-Quelle dar. Tyrosin war günstig. Abweichungen von der Wuchsform waren ähnlich denen bei Ammontartrat und Ammonoxalat, selten erschienen Anastomosen.

In weiteren Reihen wurden nun die N-Quellen in Verbindung mit Saccharose geprüft, um festzustellen, ob die für diese C-Quelle bezeichnende Wuchsform dadurch beeinflußt werden würde. Nach 7 tägiger Kultur war die Entwicklung bei allen gut, zum Teil war sie bei Ammonsulfat, Ammonnitrat und Asparagin besser als bei den Kontrollen. Förderlich war auch Tyrosin, während Hydroxylamin die Keimung völlig unterdrückte. Glykokoll wirkte nicht eindeutig. Gelatine



hatte zuerst eine günstige Wirkung, die dann aber rasch nachließ. Hier lag nach meiner Meinung mangelhaftes Sporenmaterial vor.

Allgemein entstand der Eindruck, daß nur die organischen Verbindungen förderlich waren. Die Wuchsform der Keimlinge war etwas gedrunken. Aber es bestätigte sich der Eindruck, daß — ähnlich wie bei den variierten C-Quellen — ein bezeichnender Habitus erst nach etwa 9 Tagen erkennbar wird. Nach 20 Tagen ergab sich ein sehr verändertes Bild. Teilweise hatten die Kulturen das Wachstum eingestellt, teilweise sich aber überraschend schnell entwickelt. Als ausgesprochen ungünstige Kombination erwies sich Saccharose/Pepton. Die Zellen waren tonnenförmig, niemals zeigte sich ein verknäult gewachsenes Mycel, wie es auf Saccharose/Asparagin häufig zu sehen war. Anastomosen fehlten. Der Vergleich mit der vorangegangenen Versuchsserie (Pectin mit verschiedenen N-Quellen) läßt annehmen, daß in den Nährstoffansprüchen des Pilzes eine Verschiebung eingetreten war. Pectin gestattet offenbar eine weitergehende Unabhängigkeit des Wachstums von dargebotenen N-Quellen als Saccharose. Es ist wohl vorstellbar, daß die Keimlinge ihr N-haltiges Sporenmaterial je nach der Kohlenhydraternährung verschieden schnell aufbrauchen. Auf Saccharosenährboden ist das eben der Fall, daher tritt die Assimilation des N mehr in den Vordergrund, die Reaktion auf die verschiedenen N-Verbindungen wird erheblicher, wenn Saccharose als C-Quelle geboten ist. Wenn auch die kugelige Zellform nicht immer gleich gut zu erkennen war, so blieb doch die deutliche Septierung des Mycels und der gedrungene Habitus erhalten. Es dürfte also auch hier die C-Quelle für den Habitus maßgeblich sein. Von den organischen N-Quellen hatten Asparagin, Gelatine und Tyrosin guten Nährwert, auch Diphenylamin war einmal recht günstig (dicht gewachsenes Mycel!). Glykokoll war weniger nutzbar. Anorganisch gebundenes N wurde gut assimiliert aus Ammonoxalat, Ammontartrat, Ammonchlorid, Ammoncarbonat, weniger gut als Ammonnitrat. Teilweise blieben die Kulturen auf Ammonnitrat und Ammonsulfat auf frühen Stufen der Entwicklung stehen. Ammonsulfat bewirkte auffallend reiche Bildung granulierten Inhalts in allen Zellen, wie es sonst nie zu beobachten war oder nur gering und in basalen Zellen.

Glykol, das sich bereits bei der Prüfung der C-Quellen (und Asparagin als N-Quelle) als entwicklungshemmend erwiesen hatte, zeigte das auch in Verbindung mit anderen N-Quellen. Die Keimlinge der verschiedenen Kulturen waren einander sehr ähnlich, stets erschien ein grobkörniger Sporenhalt, mehr oder minder zusammengeballt, meist stark zerklüftet. Die hemmende Wirkung des Glykols konnte in geringem Maße durch Asparagin, Ammonoxalat, Ammontartrat und zum Teil durch Albumin behoben werden. Es entstanden bei diesen Kulturen Keimschläuche von der 4—6fachen Länge der Sporen, bei den Kontrollen



waren sie nur ebenso lang wie die Spore. Bei anderen Verbindungen waren sie zum Teil noch kürzer. Offenbar ermöglichte das C-haltige Anion den Keimlingen Deckung des Nährstoffbedarfs in geringem Umfange daraus. Die Entwicklung war bei der ganzen Versuchsserie auf so früher Stufe stehen geblieben, daß praktisch Assimilation der gebotenen Nährstoffe gar nicht stattfinden konnte. Das bestätigt die früher gemachte Annahme der notwendigen Trennung von Keimung und Wachstum: Glykol ist wachstumshemmend, nicht keimungshemmend. Der Stoff fixiert damit gleichsam das entscheidende Stadium, den Übergang von Keimung zu Entwicklung, der sich bei den nicht glykolphaltigen gut assimilierbaren Nährstoffen ohne sichtbare Anzeichen vollzieht. Die Wirkung des Glykols ist geringer als die des Hydroxylamins, das selbst die Keimung unterdrückt.

Eine weitere Serie galt dem Glycerin in Verbindung mit verschiedenen N-haltigen Substanzen. Das Material in der Spore wurde sehr rasch (schon nach 7 Tagen) verbraucht. Offenbar deckt also der Keimling frühzeitig seinen Bedarf aus dem Substrat, das ihm leicht zugänglich ist. Daher macht sich dann der Einfluß des N auch früher als bei anderen C-Quellen bemerkbar. Die organischen Verbindungen waren nach 7tägiger Kulturdauer den anorganischen sichtlich überlegen. Die Wuchsformen waren meist schlank, Septierung kaum sichtbar. In einigen Fällen wurde leicht tonnenförmiges Mycel gebildet — ragte aber aus dem Hängetropfen heraus, war also vielleicht ein Luftmycel. Auf Pepton war der Habitus der Keimlinge zum Teil gedrungen, es traten auch zahlreiche Seitenästchen auf. Nach 20 Tagen war der erwähnte Unterschied zwischen organischen und anorganischen Verbindungen noch deutlicher. Die letzteren waren mit Glycerin nicht gut verwertbar. Glykokoll hemmte wieder deutlich.

Dieses Ergebnis hat bisher keine Bestätigung in anderer Literatur. Die Aminoessigsäure gilt allgemein als geeignete N-Quelle für Pilze. Meine Untersuchungen über die Ausnutzbarkeit dieser Verbindung für den Flechtenpilz werden der Forderung RIPPERS nach einer geeigneten Nährlösung als Voraussetzung für die Verwendung des Glykokolls insofern gerecht, als ja die Aminoessigsäure in Verbindung mit verschiedenen C-Quellen geprüft wurde. Das Ergebnis war aber weder mit Saccharose, noch mit Glycerin günstiger. Nach RIPPERS ist es notwendig, sich bei der Beurteilung der Aminosäuren hinsichtlich ihres Nährwertes Zurückhaltung aufzuerlegen, da den Aminosäuren außer der N-Nährstoffwirkung noch andere Wirkungen, z. B. als Kohlenstoffquelle, eigen sein können.

Recht gute Entwicklung zeigten vielfach die Kulturen, denen Kaliumnitrat zugesetzt war. Bei einem Versuch lagen die Verhältnisse jedoch umgekehrt: es förderten fast alle anorganischen Salze das Wachstum mehr als die organischen Verbindungen. Anastomosen fehlten meist.

Kulturen auf festem Nährboden. Parallelkulturen wurden mit 1,5% Agar angelegt. Sie wuchsen weit besser als die im Hängetropfen, doch hatten die letzteren den Vorzug, daß bei ihnen die Ejakulation schnellere Keimung brachte und nicht wie auf dem Agar Wasserverlust und Abschluß durch ein sich bildendes Häutchen die Entwicklung hemmte. Denn die keimenden Sporen sind gegen Wasserverlust und wechselnde Feuchtigkeit recht empfindlich. Auch bei den Agarkulturen wurden die organischen N-Verbindungen besser assimiliert. Asparagin und Gelatine waren am günstigsten. Außer der C-Quelle erwies sich aber auch die Konsistenz des Nährbodens von Bedeutung für die Wuchsform. Niemals erschien hier ein so zartes Mycel wie bei Glycerinkulturen, der Wuchs war gedrungener und etwas starr. Glykokoll wirkte wiederum hemmend. Erst am 7. Tage erfolgte die Keimung. Ähnliches haben SCHOPFER und BLUMER bei *Trichophyton album* beobachtet, wo die Mycelbildung mit Glykokoll als N-Quelle erst nach 12 Tagen Keimung bewirkte. Bei längerer Dauer (nach 26 Tagen) war die Aminosäure aber doch recht gut verwertbar. Das beweist, daß längere Beobachtungsdauer wichtig für die Erkennung der Wirkung einzelner Stoffe ist.

Wenn auch schon einige organische N-Quellen herangezogen worden waren, so wurden doch noch eine Anzahl weiterer geprüft:

Asparagin,	Tryptophan,	Cystin,	Arginin,
Asparaginsäure,	Tyrosin,	Valin,	Prolin,
Glutaminsäure,	Glykokoll,	Leucin,	Oxyprolin.
Phenylalanin,	Alanin,	Serin,	

Als C-Quelle wurde dem Nährboden Pectin zugesetzt. Im allgemeinen war das Ergebnis mit wenigen Ausnahmen kein günstiges. Daß nicht etwa zu niedere Temperatur des Raumes die Ursache davon war, erhellte daraus, daß Vergleichskulturen bei 18—20° und 70% Luftfeuchtigkeit ebenfalls nicht besser ausfielen. Wahrscheinlich ist das Sporenmaterial in den Wintermonaten, in denen die Versuche liefen (Dezember/Januar), nur in geringerem Umfang zur Keimung befähigt, während andererseits im Mai die Keimung sehr reichlich ausfiel. Es dürfte hier also ein jahreszeitlicher Rhythmus vorliegen, der wohl sowohl für Keimung wie für Entwicklung gelten kann.

Vielfach traten starke Quellungen der Sporen und Austreten des Inhaltes auf. Gute N-Quellen waren Tyrosin, auch Arginin, Prolin und Oxyprolin. Doch können diese Versuche nur als vorläufig angesehen werden. Erst weitere in anderer Jahreszeit hätten Endgültiges über die Bedeutung der organischen N-Quellen festzustellen erlaubt. Aus den eingangs erwähnten Gründen wurden die Reihen aber im Februar 1945 vernichtet, und die Arbeiten mußten abgebrochen werden.

### Zusammenfassung.

Die Ernährungsbedingungen von Pilz und Alge müssen bei den Flechten völlig getrennt untersucht werden. In diesem Sinne wurden hier für den Pilz der *Xanthoria parietina* zahlreiche Quellen für C wie für N, auch in verschiedener Kombination hinsichtlich ihrer Wirkung untersucht, wobei besonders auch Keimung und Wachstum (Mycelbildung und Mycelhabitus) voneinander getrennt wurden. Die Kulturen waren teils Einspor-, teils Ejakulations-Kulturen und erfolgten teils im Hängetropfen, teils auf Agar, stets aber in monatelanger Beobachtung. Von den zahlreichen C-Quellen hatten Erythrit und Pectin, auch Glycerin, positiven Einfluß auf Keimung und auf Entwicklung, Glykol z. B. aber ausgesprochen negativen. Die auftretenden Wuchsformen waren sehr bezeichnend und kehrten regelmäßig wieder. Sichtlich ist es die C-Quelle, die sie bestimmt. Das läßt auch nachträglicher Übergang auf andere C-Quellen gut erkennen. Unter den N-Quellen, die ebenfalls mit verschiedenen C-Quellen untersucht wurden, werden Ammonchlorid, Ammoncarbonat, Ammonnitrat und Harnstoff gut verwertet, während Hydroxylamin und — wenigstens anfangs — auch Diphenylamin toxisch wirken. Die N-Quelle hat aber keinen Einfluß auf die Wuchsform, auch wird offenbar der N-Bedarf erst später aus dem Substrat gedeckt. Glykol wirkt wachstums-, aber nicht keimungshemmend.

### Literatur.

- BARTUSCH, H.: Arch. Mikrob. **3**, 122 (1931). — BREFELD, O.: Mykol. Untersuchungen XV. (1908). — CZAPEK, F.: Biochemie der Pflanzen, Bd. I, 210. G. Fischer, Jena, 1913. — FALCK, R.: Mykol. Untersuchungen u. Berichte, 77 u. 370 (1923). — FRIES, N.: Über d. Bedeutung v. Wuchsstoffen f. d. Wachstum versch. Pilze. Uppsala 1938. — MÖLLER, A.: Diss. Münster i. W. (1887). — RACIBORSKI, M. Bull. Acad. Sc. Krakau. Cl. Sc. math. et nat. (1907) 898. — RÄMSCH, H.: Arch. Mikr. **10**, 279 (1939). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie, J. Springer, Berlin 1947 (S. 125). — SCHOPFER, W. H., u. S. BLUMER: Protoplasma **34**, 524 (1940). — C. R. Ac. d. Sc. Paris **206**, 1141 (1938). — SCHOSTAKOWITSCH, W.: Flora **81**, 362 (1895). — THOMAS, E. A.: Beiträge z. Krypt. Flora d. Schweiz **9**, 1 (1939). — TOBLER, F.: Ber. D. Bot. Ges. **27**, 421 (1909), **29**, 3 (1911). — Biologie d. Flechten. Bornträger, Berlin 1925. — Die Flechten. G. Fischer, Jena 1934. — Planta **34**, 34 (1944). — UBER, F. M., u. D. R. GODDARD: J. Gen. Physiol. **17**, 577 (1934). — WERNER, R. G.: Bull. Soc. mycol. d. France **41**, 385 (1925). — Recherches biologiques sur les Ascomycetes des Lichens. Thèse, Mulhouse. (1927). — WINDISCH, S.: Arch. Mikrob. **8**, 321 (1937).



(Aus dem Botanischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim.)

## Über die Beziehungen zwischen Hydratur und Wachstum bei Bakterien und Hefen.

Von

ERWIN BURCIK.

Mit 18 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Oktober 1949.)

Alle Lebensvorgänge sind an das Vorhandensein von Wasser geknüpft. Während jedoch über die Wasserverhältnisse der höheren Pflanzen eingehende, umfangreiche Untersuchungen vorliegen, finden sich für Bakterien und Hefen in dieser Hinsicht nur vereinzelte, mehr oder weniger skizzenhafte Literaturangaben. Zudem wurden gerade diese Untersuchungen vielfach mit unzulänglichen Methoden durchgeführt. Diese Lücke zu schließen, war Zweck der hier mitzuteilenden Versuche.

WALTER (1931) hat gezeigt, daß nicht der Wassergehalt, also die Menge des vorhandenen Wassers ausschlaggebend ist, sondern der Wasserzustand, für den WALTER den Ausdruck *Hydratur* geprägt hat. Er zeigte, daß direkte Beziehungen bestehen zwischen dem osmotischen Wert und der Hydratur der Pflanzen. Als Maß für die Hydratur kann uns die relative Dampfspannung dienen, die somit auch zur Klärung der Wasserverhältnisse auf biologischem Gebiete angewendet werden kann. Diese Tatsache ermöglicht eine bequeme und vor allem methodisch weitgehend einwandfreie Veränderung der Hydraturverhältnisse bei der Untersuchung von Mikroorganismen. Diese wurden bei den meisten früheren Untersuchungen durch Zusatz osmotisch wirksamer Mittel zu den Nährlösungen zu erreichen versucht. Nachteile dieser Methode sind die vielfach noch unklaren Dissoziationsvorgänge sowie der spezifische Einfluß der osmotisch wirksamen Zusätze auf die zu untersuchenden Mikroorganismen. Häufig kann daher bei solchen Versuchen nicht entschieden werden, ob eine beobachtete Wachstumshemmung auf ungünstige Wasserverhältnisse oder nur auf eine spezifische Wirkung des jeweils angewendeten Mittels zurückzuführen ist. Überdies ist die dauernde mikroskopische Kontrolle ohne eine Störung des Wuchsverbandes und die Gefahr einer Verunreinigung schwer möglich und zeitraubend.

Diese Nachteile vermeidet die Methode der Untersuchung in einem abgeschlossenen Luftraum mit verschiedenem Wasserdampfgehalt, wie sie von RENNER (1911), WALDERDORFF (1924) und in verbesserter Form von WALTER (1924), HEINTZELER (1939) und v. PLOTHO (1940) angewendet wurde: Über Lösungen mit einem bestimmten Dampfdruck befindet sich in einer geschlossenen Kammer (Glasschälchen) der Nährbodentropfen mit den zu prüfenden Mikroorganismen. Bei Verwendung flüssiger Nährböden könnte man allerdings mit Recht einwenden, es handle sich letzten Endes auch nur um eine Erhöhung der Salz-, bzw. Zuckerkonzentration im Nährboden infolge des Wasserentzuges durch die im Versuchsraum vorhandene Salzlösung. Wird aber Gelatine als



Nährboden verwendet, so handelt es sich in der Tat mehr oder weniger nur um die erwünschte „physikalische Trockenheit“ des Substrates, wie die weiter unten mitgeteilten Parallelversuche mit äquilibrierten Salzlösungen zeigen werden.

### A. Methodik.

Grundlage der verwendeten Methode der Veränderung der relativen Dampfspannung<sup>1</sup> ist die Tatsache, daß jede wäßrige Lösung in einem abgeschlossenen Luftraum eine bestimmte Menge Wasserdampf abgibt. Je konzentrierter die Lösung ist, desto geringer ist der Wassergehalt der Luft. Dieser, ausgedrückt in % der Dampfsättigung über reinem Wasser (= 100%) — bei gleicher Temperatur — ergibt den Wert der jeweiligen relativen Dampfspannung.

WALTER (1936) gibt in seinen Tabellen eine Zusammenstellung verschieden konzentrierter NaCl-Lösungen mit den zugehörigen r. D.- und Atmosphärenwerten. Die bei meinen Versuchen verwendeten Lösungen sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Die Herstellung der Lösungen erfolgte gravimetrisch mit nachträglicher Kontrolle durch Messung mit einem Aräometer. Zur Aufbewahrung dienten Schliffstopfenflaschen, die Entnahme erfolgte jeweils mit sauberer, trockener Pipette, die immer nur für je eine Lösung verwendet wurde.

Als Kulturgefäße benutzten RENNER (1919) und WALDERDORFF (1924) einfache Objektträger mit Hohlschliff und aufgeklebten Deckgläsern. WALTER (1924) und im Anschluß an diesen HEINTZELER (1939) und v. PLOTHO (1940) bedienten sich kleiner runder Schälchen von 3,5 cm Durchmesser und 1,5 cm Höhe, die wesentlich bessere Kulturbedingungen, vor allem für längere Versuchsdauer, boten. Wegen der ungünstigen optischen Verhältnisse für feinere Untersuchungen an sehr kleinen Mikroorganismen ging ich nach umfangreichen Vorversuchen zur Verwendung anderer feuchter Kammern über, die folgendermaßen hergestellt wurden: Etwa 20 mm weite und 6—8 mm hohe, oben und unten plangeschliffene Glasringe wurden mit Kanadabalsam auf Objektträger gekittet. Sowohl der zur Verfügung stehende Luftraum als auch die Menge der NaCl-Lösungen ist selbst für längere Versuchsdauer ausreichend, andererseits sind die optischen Bedingungen wesentlich besser als bei Verwendung höherer Schälchen.

Die Vaselinedichtung für die Deckgläsern wurde ebenfalls gleich auf Vorrat vorbereitet. In einem Porzellantiegel wurde reine, weiße Vaseline verflüssigt und der obere Rand des Ringes der feuchten Kammer mit der Oberfläche der Vaseline in Berührung gebracht. Darauf wurde der Objektträger rasch umgedreht. Auf diese Weise erhält man rasch und sicher gleichmäßig hohe Vaselinedichtungen, auf die später die Deckgläsern aufgelegt werden.

Als Nährböden dienten fast ausschließlich Gelatinesubstrate, weil sich Agar wegen seiner besonderen Quellungsverhältnisse als ungünstiger erwies. Die Herstellung erfolgte nach den unten angegebenen Rezepten. Um Fehlerquellen durch etwa wechselnde Qualität der Nährböden auszuschalten, wurden stets größere Mengen (1—3 l) hergestellt, die bei dem äußerst sparsamen Verbrauch dieser Methode für lange Zeit reichten. Die Abfüllung erfolgte zu 100—200 cm<sup>3</sup> in Patentverschlußflaschen, von diesen zum Gebrauch in Röhrchen zu je etwa 10 cm<sup>3</sup>. Verflüssigt wurde vor Gebrauch jeweils im Wasserbad. Als Nährböden wurden verwendet:

<sup>1</sup> Hierfür wird im Folgenden stets die Abkürzung „r. D.“ gebraucht.

Nährgelatine: Liebigs Fleisch-extrakt 10 g, Pepton „Witte“ 10 g, NaCl 2 g, Gelatine alba 100 g, Aqua dest. 1000 cm<sup>3</sup>.

$\frac{1}{3}$  D-Gelatine nach MEYER: Dextrose 3 g, Pepton „Witte“ 4 g, Liebigs Fleischextrakt 3 g, NaCl 1 g, Gelatine 100 g, Aqua dest. 1000 cm<sup>3</sup>.

Möhrensaft-Gelatine: 500 g geschälte, geriebene Möhren in 1 l Wasser 30 min kochen, filtrieren, Filtrat mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung bis zur erkennbaren Rotfärbung von Phenolphthalein neutralisieren, 10% Gelatine zusetzen, lösen und nochmals pH einstellen. Zuletzt filtrieren und abfüllen. Die Reaktion geht bei längerer Aufbewahrung zurück, muß also immer wieder geprüft werden.

Bohnengelatine nach SCHANDERL: 200 g sorgfältig ausgelesene weiße Bohnen in 1 l Leitungswasser über Nacht quellen lassen, 2 Std kochen, dabei darauf achten, daß die Bohnen nicht platzen, abgießen, auffüllen auf 1 l, dazu: Pepton „Witte“ 5 g, Dextrose 5 g, NaCl 2 g, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g, Gelatine 100 g. Quellen lassen, lösen, filtrieren, abfüllen.

Der Herstellung der Nährbodentropfen wurde besondere Sorgfalt gewidmet. Die mit Chromschwefelsäure und 10% iger Kalilauge gereinigten, darauf sorgfältig gewässerten und getrockneten Deckgläsern wurden in PETRISchalen ausgelegt, in diesen im Trockenschrank bei 160° C 2 Std lang sterilisiert. Der verflüssigte Nährboden wurde im sterilen Impfraum mit einer 2 mm-Öse auf das Zentrum des Gläschens aufgetragen und mit kreisender Bewegung zu gleichmäßigen, etwa 4–5 mm im Durchmesser betragenden, flachen Tröpfchen ausgebreitet. Die Gelatinetropfen wurden in der geschlossenen PETRISchale innerhalb 30–60 min lufttrocken und damit impfbereit.

Zum Beimpfen wurden ein paar Ösen der Ausgangskultur in dem jeweiligen flüssigen Nährboden in sterilen UhrsChälchen verrieben. Mit steriler

Tabelle 1. *Verwendete NaCl-Lösungen mit ihren r. D.- und Atmosphärenwerten nach H. WALTER (1931, S. 163).*

Stufe	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
relative Dampfspannung	100	99,0	98,2	97,4	96,5	95,4	94,3	93,6	92,4	91,5	90,4	89,4	88,0	86,8	85,6
Atmosphären (abgerundet)	0	14	25	35	46	59	72	86	103	118	135	151	173	193	211
g NaCl in 100 Teilen Wasser	0,0	1,5	3,0	4,5	5,9	7,0	9,0	10,6	12,3	14,0	15,7	17,5	19,3	21,2	23,1
spez. Gewicht	1,00	1,01	1,02	1,03	1,04	1,05	1,06	1,07	1,08	1,09	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14

Impf-(Zeichen-)Feder wurde von der homogenen Emulsion entnommen und im Zentrum der auf den Deckgläschen angetrockneten Nährbodentropfen aufgetupft. Auf diese Weise gelingt es verhältnismäßig leicht, gleichmäßige Impfungen innerhalb einer Serie zu erzielen. Eine geringe Ausgangskeimzahl erwies sich günstiger als die von früheren Autoren verwendeten größeren „Impfbröckchen“, weil bei geringer Aussaatmenge auch spärliche Wachstumserscheinungen einzelner Zellen noch deutlich wahrnehmbar sind.

Unmittelbar nach dem Beimpfen werden die Deckgläschen über die kurz vorher mit den NaCl-Lösungen beschickten Kammern gedeckt. Eine rasche und sichere Abdichtung wird leicht durch einen kleinen Kunstgriff erzielt: Ein Drahring von gleichem Durchmesser wie die feuchten Kammern wird in der Flamme erhitzt und von oben her dem Deckglas genähert, eventuell auch direkt aufgesetzt. Die Vaseline schmilzt und breitet sich kapillar, einen dichten Verschuß herstellend, zwischen Glasring-Rand und Deckgläschen aus. Von den NaCl-Lösungen wurde so viel eingefüllt, daß zwischen ihrer Oberfläche und dem Gelatinetropfen ein Luftraum von 2—3 mm frei blieb.

Die Aufstellung der Kulturen erfolgte in einem 20°-Thermostaten, dessen Temperatur durch eingestelltes Maximum-Minimum-Thermometer kontrolliert wurde. Bei Schwankungen von mehr als  $\pm 1,5^\circ \text{C}$  wurden die Versuche neu angesetzt. Die tägliche, mitunter sogar mehrstündige Beobachtung der Kulturen machte gelegentliche Temperaturschwankungen unvermeidlich. Mehrfache Kontrollversuche ergaben aber, daß dadurch die Ergebnisse keine wesentliche Beeinträchtigung erfahren, vor allem, wenn alle Stufen einer Serie den gleichen Schwankungen ausgesetzt sind.

Zur Beobachtung der Kulturen diente ein apochromatisches Forschungsmikroskop von ZEISS in Verbindung mit einer geeigneten Lichtquelle („Sphärolux“ und „Monla“). Die Einwirkung von Wärmestrahlen wurde durch Zwischenschaltung einer Küvette mit MOHRscher Salzlösung gemildert. Die Beleuchtung erforderte eine besondere Beachtung, weil nur bei optimalem Strahlengang eine genaue Beobachtung, z. B. einzelner Bakterienzellen, möglich ist. Durch Abänderung eines zur Beweglichkeitsprüfung bei Mikroorganismen angegebenen Verfahrens (BURCIK, 1949) wurde ein Dunkelfeldeffekt erzielt, der eine einwandfreie Beobachtung zuläßt. Wird der Kondensor, dessen Frontlinse abgeschraubt ist, gesenkt und die Abbe-Iris schief gestellt, so kann eine Schrägbeleuchtung erzielt werden. Durch die plastische Licht-Schatten-Wirkung sind die Organismen bedeutend besser zu erkennen als im üblichen Hellfeld bei gleicher Vergrößerung.

Die Mikroaufnahmen wurden mit der „Contax-Miflex“, der Aufsatzkamera „Makam“ von LEITZ und der Vertikalkamera nach HEGENER von ZEISS angefertigt.

## B. Versuchsergebnisse.

### Vorbemerkungen über das Wachstum von Bakterien bei verschiedener relativer Dampfspannung.

In bezug auf ihre Hydraturverhältnisse können wir zwei große Gruppen unterscheiden (WALTER, 1931): Die homoiohydren Pflanzen (Blütenpflanzen), die eine eigene Hydratur besitzen, die sie innerhalb gewisser Grenzen unabhängig von den Wasserverhältnissen ihrer Umwelt aufrecht erhalten können, und die poikilohydren pflanzlichen Organismen (Bakterien, Pilze, Algen, Flechten, Moose), die in ihrer Hydratur vollkommen von der Außenwelt abhängig sind. Es ist einleuchtend, daß gerade das Plasma der Vertreter der zweiten Gruppe, die nicht über die Schutzeinrichtungen der Blütenpflanzen verfügen (Einschränkung der Transpiration, Wasserspeicherung, Cuticulaschutz, Abschluß auch gegen den Boden bei Kakteen



usw.), besonders widerstandsfähig gegen rasche Austrocknung sein muß. In sehr ausgeprägter Form tritt uns diese Resistenz in den Bakteriensporen entgegen. Aber auch Organismen, bei denen derartige „Ruhe-“ oder „Dauerformen“ nicht gebildet werden, erweisen sich vielfach auffallend unempfindlich gegen Austrocknung. Für die Verbreitung und Arterhaltung ist diese Trockenresistenz zweifellos von größter Bedeutung.

Wichtiger, vor allem für praktische Belange, ist aber die Frage, unter welchen Hydraturbedingungen niedere Organismen noch lebensfähig sind. Nur diese Verhältnisse sollen im folgenden berücksichtigt werden. Als Kriterium der Lebensfähigkeit wurde das Wachstum gewählt, obwohl wir uns bewußt sein müssen, daß auch bei Bakterien und Hefen durchaus nicht immer die Gleichung Wachstum = Stoffwechselfähigkeit gültig sein wird. Eine physiologische Tätigkeit ohne sichtbares Wachstum (= Zellteilung) ist sehr gut denkbar. Immerhin dürften wir wohl nicht fehlgehen mit der Annahme, daß eine einigermaßen „normale“ physiologische Tätigkeit auch Wachstum zur Folge hat und letzteres somit weitgehend einen Maßstab für die stoffwechselphysiologische Aktivität der untersuchten Mikroorganismen abgibt.

Einer quantitativen Erfassung der beobachteten Wachstumsvorgänge standen von vornherein unüberwindliche technische Schwierigkeiten im Wege. Die von WALTER (1924) und HEINTZELER (1939) bei Schimmelpilzen geübte Messung des Durchmessers der Kolonien kam für Bakterien und die meisten Hefen nicht in Frage wegen der zu geringen Flächenausdehnung der entstehenden Kolonien. Exakte Keimzahlbestimmungen wären zwar grundsätzlich möglich, mußten jedoch wegen der großen Zahl von Einzelversuchen unterbleiben. Eingehende Vorversuche zeigten jedoch, daß eine einfache Schätzung der relativen Wachstumsintensität, bezogen auf die maximale Entwicklung unter den gegebenen Bedingungen, einen guten Einblick in das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Arten gestattet. Die näheren Daten und deren graphische Darstellung in den Wachstumsdiagrammen sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. Grade des Entwicklungszustandes und graphische Darstellung.

Stärke	Entwicklungszustand	Breite der „Wachstumsstreifen“ in der graphischen Darstellung
5	Kolonie bedeckt den ganzen Nährbodentropfen .....	
4	üppiges Wachstum .....	
3	gutes Wachstum .....	
2	makroskopisch sichtb. Wachstum .....	
1	mikroskopisch sichtb. Wachstum .....	
*	an einzelnen Zellen sichtbares Wachstum .....	
0	kein Wachstum feststellbar .....	



Durch am ersten Tage 2—4stündliche, später tägliche mikroskopische Untersuchung wurde auch der Wachstumsbeginn (= erste feststellbare Zellteilung!) bestimmt. In den graphischen Darstellungen ist dieser Entwicklungsbeginn bei verschiedener r. D. durch eine geglättete Kurve (— · — · — · — · —) dargestellt. In den Stufen hoher r. D. wurden die Zeiten durch zum Teil stündliche Beobachtung festgelegt, in den niedrigeren Stufen durch die stets durchgeführte tägliche Untersuchung. In vielen Fällen ist es schwer oder sogar unmöglich, den genauen Zeitpunkt der ersten Zellteilung zu bestimmen. Außerdem spielt das jeweilige Alter der einzelnen ausgeimpften Zellen eine gewisse Rolle, denn es konnte festgestellt werden, daß sich die einzelnen Individuen des Impftropfchens oft im Abstand mehrerer Stunden hintereinander zum erstenmal teilen. Dies war insbesondere in den Stufen mit niederer r. D. der Fall, wo zum Teil Unterschiede von 2—4 Tagen beobachtet wurden. Aus diesem Grunde ist vor allem bei niederer r. D. der Zeitpunkt der ersten Entwicklung nicht genau festzustellen. In den Diagrammen ist diese Zone der ersten Wachstumsvorgänge durch feine gebrochene Linien dargestellt. Die untere Spitze der so entstehenden Dreiecke bezeichnet also den mittleren Zeitpunkt des Angehens der Kultur.

Die ungefähre Dauer der Entwicklung ist durch die Höhe der Wachstumsstreifen in den Diagrammen gegeben. Am oberen Ende war das Maximum der Entwicklung erreicht und weiteres Wachstum konnte nicht mehr festgestellt werden. Daß diese Darstellung jedoch nur Näherungswerte angeben kann, ist klar. Das Ende der Entwicklung wird ja wohl kaum durch die jeweiligen Hydraturbedingungen bedingt sein, sondern in erster Linie von der Erschöpfung der Nährstoffe, Bildung schädlicher Stoffwechselprodukte usw. abhängen. Immerhin ergibt die Dauer des Wachstums, wenigstens in den oberen und mittleren Stufen, zusammen mit den anderen Angaben (Wachstumsbeginn und Intensität) einen abgerundeten Überblick über das Verhalten der geprüften Mikroorganismen bei verschiedener r. D.

### Wachstum von Bakterien bei verschiedener relativer Dampfspannung.

#### *Bact. prodigiosum.*

Stämme: Nr. 398 alter Sammlungsstamm, Nr. 4735 Sammlungsstamm Göttingen, Nr. 461 aus Erde isoliert 1946, Nr. 4745 von gekochten Kartoffeln isoliert 1947.

Jeweilige Ausgangskultur: 8 Tage altes  $\frac{1}{3}$  D-Agar-Schrägröhrchen, im Versuch wurde  $\frac{1}{3}$  D-Gelatine verwendet.

Schon von 99% r. D. an zeigte sich deutliche Hemmung des Anwachsens (Abb. 1). Nach 3—4 Tagen waren die Nährbodentropfen der ersten beiden Stufen fast völlig verflüssigt. Während sich aber in einigen Tagen die Intensität des Wachstums, besser gesagt der Entwicklungszustand, bis etwa 97% r. D. hinab ziemlich ausglich, blieb das Wachstum von 96,5% r. D. ab dauernd stark zurück. Die vier untersuchten Stämme zeigten bis auf geringe Abweichungen das gleiche Verhalten. Unterhalb 94,5% r. D. war in keinem Falle mehr Wachstum zu bemerken. Die Wachstumsgrenze liegt demnach bei etwa 95% r. D.

WALTER (1924) fand als Grenzwert 96—97% r. D., also eine geringere Resistenz der Keime, was auf die verwendete größere Impfmenge zurückzuführen sein dürfte, bei der geringe Wachstumsvorgänge nicht mehr feststellbar sind.

#### *Bact. coli.*

Stämme: Nr. 4012 alter Sammlungsstamm, Nr. 43123 aus Stuhl isoliert 1943, Nr. 46/3a aus Stuhl isoliert 1946.

Jeweilige Ausgangskultur: 8 Tage altes Nähragar-Schrägröhrchen, im Versuch wurde Nährgelatine verwendet.

Alle drei Stämme waren stoffwechselphysiologisch gleiche Typen: „Imvic“ ++—, keine Gelatineverflüssigung,  $H_2S$ , aus Lactose und Dextrose Säure und Gas, schwache Beweglichkeit (vergl. PARR, 1939).

Trotz dieser Übereinstimmung waren die Wachstumsgrenzen verschieden. Bei Stamm 4012 war deutliche Hemmung schon von 99% r. D. ab vorhanden, deutliches Maximum bei 100% r. D. Das allgemeine Verhalten der beiden anderen Stämme in bezug auf den Verlauf des Wachstums stimmte gut damit überein, nur zeigten sie auch noch bei 95,4 bzw. 93,6% r. D. schwache, stark gehemmte Entwicklung. Die Wachstumsgrenze schwankt demnach für *Bact. coli* zwischen 96 und 93,5% r. D.

Auch hier liegen die von mir ermittelten Grenzwerte niedriger, zum Teil sogar wesentlich tiefer als die von WALTER (1924) beobachteten. Neben dem schon bei *Bact. prodigiosum* angeführten Grunde scheinen hier auch Stammesunterschiede eine Rolle zu spielen, worauf in einem späteren Kapitel näher eingegangen werden wird.

### *Bact. radiculicola*.

Stämme: Nr. 402 alter Sammlungsstamm (*Medicago*), Nr. 4076 aus *Vicia faba* isoliert 1940, Nr. 4311 aus *Trifolium pratense* isoliert 1943.

Jeweilige Ausgangskultur: 10 Tage altes Schrägröhrchen (Möhrenagar), im Versuch wurde Möhrengelatine verwendet.

Der Verlauf der Kurve des Anwachsens ist außerordentlich steil. Auch die Hemmung von 99% r. D. ab ist sehr ausgeprägt. Die Feststellung der Grenzwerte für das Wachstum war bei diesen Formen außerordentlich schwer, weil die Kulturen große Launenhaftigkeit zeigten. Es war oft nicht einmal möglich, bei gleichzeitig angesetzten Parallelversuchen genau gleiche Werte zu erhalten. Der in Abb. 2 wiedergegebene Wachstumsverlauf von Stamm 402 veranschaulicht daher nur den durchschnittlichen Typus des Verhaltens, ohne Anspruch auf absolute Reproduzierbarkeit erheben zu können. In mehr als 30 mit diesen Stämmen angesetzten Versuchen konnte unterhalb 96,5% r. D. niemals Wachs-

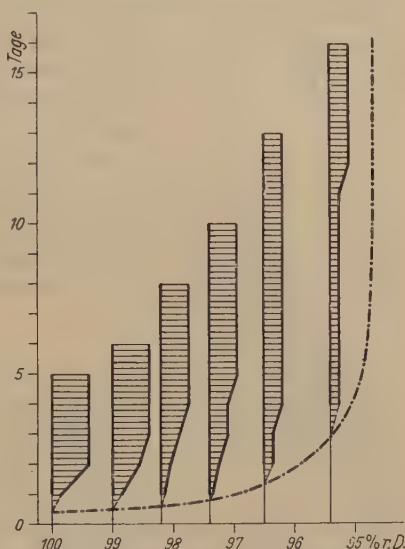


Abb. 1. *Bact. prodigiosum*. Erklärung der Darstellung: Abszisse % r. D., nach rechts zunehmender Grad der Trockenheit. Aus technischen Gründen wurden die einzelnen Stufen zum Teil nicht den runden Zahlen entsprechend gewählt. Die Wachstumsstreifen beginnen dann an den entsprechenden Stellen der Abszisse, z. B. bei 99,8 — 98,6 — 97,5% r. D. usw. Die Breite des jeweiligen Wachstumsstreifens (gestrichelte Felder) zeigt den Entwicklungszustand an den Beobachtungstagen (Ordinate!) an; hierzu vgl. Tab. 2. Die Kurve — · — · — · — gibt den Zeitpunkt des Anwachsens bei der betreffenden r. D.

tum beobachtet werden. Vielfach war die Entwicklung bereits bei 97,4% r. D. völlig unterdrückt. Das Minimum der zum Wachstum nötigen Dampfspannung dürfte demnach zwischen 98 und 96,5% r. D. liegen.

### *Pseudomonas pyocyanea.*

Stämme: Nr. 4013 alter Sammlungsstamm Kiel, Nr. 4309 aus Eiter isoliert 1943, Nr. 44120 aus Stuhl isoliert 1944, Nr. 4742 Sammlungsstamm Göttingen.

Jeweilige Ausgangskultur: 7 Tage altes Schrägröhrchen (Nähragar), im Versuch Nährgelatine verwendet.

Bei Stamm 4013 wurde in mehreren Serien gefunden, daß Wachstum nur in den ersten beiden Stufen von 100 und 99% r. D. auftrat. Bei niedrigerer r. D. konnte trotz mehrfacher Wiederholung kein Wachstum festgestellt werden. Genaue Prüfung ergab, daß alle Eigenschaften einer typischen *Pyocyanea*-Kultur vorhanden waren (Abb. 3).

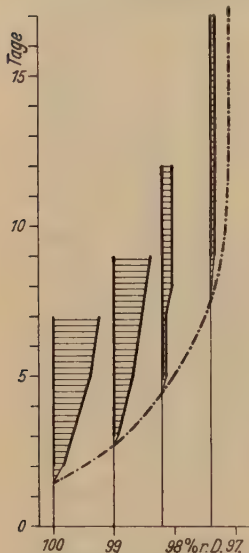


Abb. 2.

Abb. 2. *Bact. radicola*<sup>1</sup>.

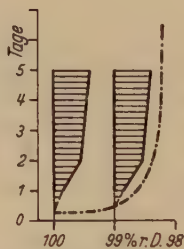


Abb. 3.

Abb. 3. *Pseudomonas pyocyanea*, Stamm Nr. 4013.

Die anderen drei Stämme (ebenfalls völlig typische Formen), verhielten sich wesentlich anders. Das Wachstumsbild stimmte in allen Punkten fast völlig mit dem von *Pseudomonas iniqua* überein. Die letzten Stufen, bei denen noch eine Entwicklung stattfand, waren 94,5% r. D. und bei Stamm 4309 95,4% r. D. Die Hydraturgrenze für die letzten drei Stämme liegt also ungefähr bei 95% r. D., während für den Stamm 4013 die Grenze knapp unterhalb 99% r. D. anzusetzen ist.

### *Gelbe Luftsarzin.*

Stämme: Nr. 43224 aus Laboratoriumsluft isoliert 1943, Nr. 443 aus Zimmerluft isoliert 1944, Nr. 46/S 3 aus Zimmerluft isoliert 1946, Nr. 46/S 4 aus Stallluft isoliert 1946, Nr. 46/S 7 aus Straßenstaub isoliert 1946.

Die Stämme 43224, 46/S 3 und 46/S 4 stimmten völlig mit der Beschreibung der *Sarcina lutea* var. *typica* (FLÜGGE em. LEHM. et STUB.) überein, Stamm 443 entsprach der für *Sarcina lutea* var. *diffluens* gegebenen Diagnose. Die Kultur 46/S 7 wurde als *Sarcina flava* (DE BARRY em. LEHM. et STUB.) bestimmt.

Jeweilige Ausgangskultur: 10 Tage altes Schrägröhrchen (Nähragar), im Versuch wurde Nährgelatine verwendet.

Allen fünf Stämmen war eine wesentlich größere Trockenresistenz eigen als den bisher besprochenen Mikroorganismen. Zwar war auch hier

<sup>1</sup> Für die Abbildungen 2 bis 11 gilt die gleiche Erklärung wie für Abb. 1.



stets bei 100% r. D. ein eindeutiges Maximum vorhanden, und das Anwachsen war auch hier schon von 98,2% r. D. ab deutlich verlangsamt. Der weitere Wachstumsverlauf, etwa vom 4. Tage ab, war aber in allen Stufen bis zu 95,4% r. D. hinunter auffallend gleichmäßig. Von 94,5% r. D. an abwärts trat dann stärkere dauernde Hemmung der Entwicklung ein; bei 92,4% r. D. war erst nach 8—10 Tagen ganz schwaches Wachstum festzustellen. Diesem Verhalten des Stammes 46/S 7 entsprachen mit geringen Abweichungen alle weiteren vier Kulturen. Die Grenzwerte der Hydratur für das Wachstum lagen bei diesen Formen demnach zwischen 93 und 91,5% r. D.

#### *Micrococcus roseus.*

Stämme: Nr. 4007 isoliert aus Laboratoriumsluft 1940, Nr. 46/S5 isoliert aus Zimmerluft 1946, Nr. 46/S12 isoliert aus Straßenstaub 1946.

Stamm 4007 und 46/S5 stimmten in allen Punkten mit der Beschreibung des *Micrococcus roseus* var. *typicus* (BUMM, LEHM. et NEUM.) überein, Stamm 46/S12 entsprach der Var. *roseo-fulvus* derselben Autoren.

Jeweilige Ausgangskultur: 10 Tage altes Schrägröhrchen (Nähragar), im Versuch wurde Nährgelatine verwendet.

Sämtliche drei Stämme erwiesen sich z. T. als gleich, z. T. als noch resistenter gegen trockenes Substrat als die gelben Luftsarzinen. Vor allem der Stamm 46/S 5 zeichnete sich durch große Toleranz gegenüber niedriger r. D. aus. Abb. 4 veranschaulicht das Verhalten dieser Kultur. Auch hier wieder bei 100% r. D. ein eindeutiges Wachstumsmaximum, im ganzen jedoch eine weit gleichmäßigere Entwicklung bei niedrigerer r. D. als bei den früher untersuchten Bakterienformen mit Ausnahme der gelben Luftsarzinen.

Die Stämme 4007 und 46/S 12 zeigten noch bei 91,5% r. D. schwaches Wachstum, 46/S 5 sogar noch bei 90,4% r. D. Das Hydraturminimum für die Entwicklung liegt demnach zwischen 91 und 90% r. D.

WALTER (1924) fand für die gleiche Bakterienart höchstens noch bei 96% r. D. Wachstum, was zweifellos wieder auf die Unterschiede in der angewandten Methodik zurückzuführen ist, denn gerade bei Kokken sind ganz schwache Wachstumsvorgänge sehr schwer zu beobachten.

#### *Versuche mit aeroben Sporenbildnern.*

Bei Versuchen mit Sporenbildnern bei verschiedener r. D. müssen folgende Vorgänge gesondert in ihrem Verhalten untersucht werden: 1. die vegetative Vermehrung, 2. die Sporenbildung und 3. die Sporenkeimung. In der vorliegenden Arbeit soll nur auf das vegetative Wachstum eingegangen werden<sup>1</sup>.

Hierbei war es notwendig, völlig sporenfreie Ausgangskulturen zu verwenden. Zu diesem Zwecke wurden die Stämme mehrere Male hintereinander in Abständen von

<sup>1</sup> Zusammenfassende Behandlung der Hydraturverhältnisse bei Sporenbildnern in einer späteren Veröffentlichung.



12—18 Std auf neue, feuchte  $\frac{1}{3}$  D-Agar-Schrägröhrchen übertragen. Etwa nach 6—8 Passagen wurde mikroskopisch auf Sporen untersucht. Waren keine zu finden, so wurde eine Aufschwemmung in  $\frac{1}{3}$  D-Bouillon hergestellt, die Hälfte zur Kontrolle in einem 8 mm weiten, dünnwandigen Röhrchen 2 min im Wasserbad bei 80° C gehalten und dann davon 3 Ösen in Bouillon und auf Agar übertragen. In fast 100 derartigen Einzelversuchen trat nur 4mal Wachstum auf, was jedoch darauf schließen ließ, daß trotz der häufigen Übertragung doch noch Sporen in der

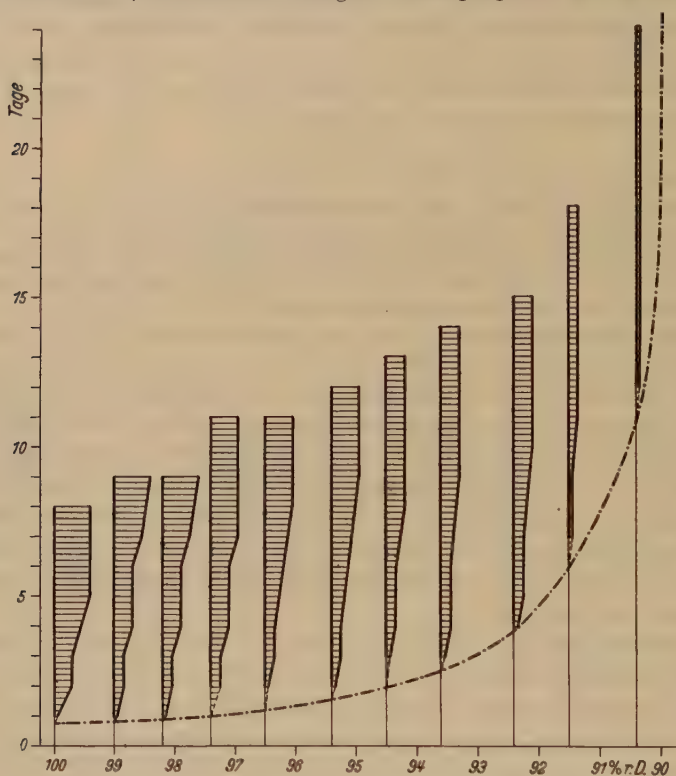


Abb. 4. *Micrococcus roseus*. Stamm Nr. 46/S 5.

Aufschwemmung vorhanden gewesen waren. In diesen vier Fällen wurden die angesetzten r. D.-Versuche selbstverständlich abgebrochen und neu begonnen. Von der ersten Hälfte der Aufschwemmung wurden gleichzeitig mit der eben geschilderten Erhitzungsprobe die Versuchsserien mit verschiedener r. D. beimpft wie bereits früher beschrieben.

Von den 16 verschiedenen bisher untersuchten Arten sei hier nur das Verhalten von 3 verbreiteten aeroben Sporenbildnern besprochen. Alle Stämme wurden vor Beginn der Versuche durch mehrfache Plattenkulturen gereinigt und nach den Methoden von MEYER, BREDEMANN, GOTTHEIL, HEIGENER und STAPP bestimmt. Die Übertragung der Stämme erfolgte in Abständen von 3—6 Monaten durch Ausimpfen gekochter Sporenaufschwemmungen auf  $\frac{1}{3}$  D-Agar-Schrägröhrchen.

*Bac. subtilis.*

Stämme: Nr. 4042 Sammlungsstamm Kiel, Nr. 4333 aus Heuaufguß isoliert 1943. Jeweilige Ausgangskultur: 18 Std altes Schrägröhrchen ( $\frac{1}{3}$  D-Agar), im Versuch wurde  $\frac{1}{3}$  D-Gelatine verwendet.

Diese Formen zeigten im Vergleich zu den untersuchten asporogenen Mikroorganismen keine Besonderheit in ihrem Verhalten bei verschiedener r. D. Hemmung des Anwachsens schon von 99% r. D. an deutlich, Ausgleich der Entwicklungsintensität in den ersten 4–5 Tagen bis zu 98,2% r. D., von da ab dauerndes Zurückbleiben hinter dem Maximum bei 100% r. D. (Abb. 5).

Die Grenzwerte des Wachstums lagen bei 95,4% r. D., darunter konnte kein Wachstum mehr beobachtet werden. Das Hydraturniveau liegt demnach bei etwa 95% r. D.

*Bac. asteroidesporus.*

Stämme: Nr. 4028 Originalstamm von A. MEYER, Sammlung Marburg, Nr. 4031 Sammlungsstamm BREDEMANN, Hamburg.

Jeweilige Ausgangskultur: 18 Std altes Schrägröhrchen ( $\frac{1}{3}$  D-Agar), im Versuch wurde  $\frac{1}{3}$  D-Gelatine verwendet.

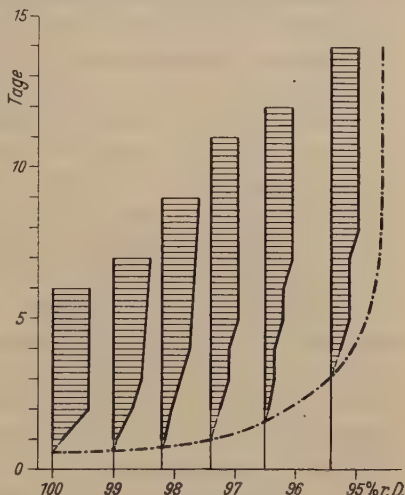


Abb. 5. *Bac. subtilis*.

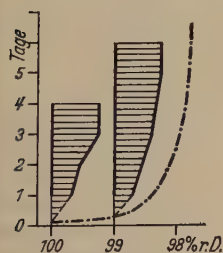


Abb. 6. *Bac. asteroidesporus*.

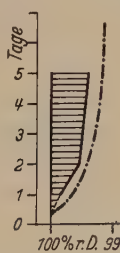


Abb. 7. *Bac. mycoides*, Stamm Nr. 4022.

Beide Stämme zeigten nur in den ersten beiden Stufen bei 100 und 99% r. D. Wachstum. Mehrere Wiederholungen der Versuche ergaben immer dasselbe Resultat. Unterhalb 99% r. D. war niemals Entwicklung zu beobachten. Wie die Abb. 6 zeigt, ist das Wachstum bei 99% r. D. zwar deutlich verlangsamt, doch wird der maximale Entwicklungszustand nach etwa 5 Tagen

auch bei dieser r. D. erreicht. Das Hydraturniveau liegt also bei etwa 98,5% r. D.

*Bac. mycoides.*

Stämme: Nr. 4022 Sammlungsstamm Hamburg, Nr. 4030 aus Bodenprobe isoliert 1940, Nr. 46/M 1 aus Bodenprobe isoliert 1946, Nr. 46/M 8 aus Bodenprobe isoliert 1946, Nr. 4739 Sammlungsstamm Göttingen, Nr. 4 xx von *Vicia faba*-Wurzel isoliert 1946.

Jeweilige Ausgangskultur: 18 Std altes Schrägröhrchen ( $\frac{1}{3}$  D-Agar), im Versuch wurde  $\frac{1}{3}$  D-Gelatine verwendet.

Ein Teil der Stämme (4022, 46/M 1 und 4739) zeigte das gleiche Verhalten wie *Bac. luteus* (vgl. Abb. 18). Fast ausschließlich trat nur in der ersten Stufe bei 100% r. D. Wachstum ein (Abb. 7).

Stamm 4030 wuchs hingegen jedesmal auch noch bei 99% r. D., in einer Versuchsserie sogar noch bei 98,2% r. D.

Stamm 4 xx zeichnete sich durch besonders schwankendes Verhalten aus. Zunächst wuchs er noch bei 97,4% r. D. Späterhin, nach etwa 5 Monaten konnte nur noch bei 98,2% r. D. Wachstum erzielt werden, häufig auch da nicht mehr. Seit dieser Zeit entwickelt sich dieser Stamm konstant nur noch in den ersten beiden Stufen bei 100 und 99% r. D. Parallel mit diesem wechselnden Verhalten ging eine Umwandlung von S nach R vor sich. Die Kultur, die bei der Isolierung (Juni 1946) eine typische Glattform des *Bac. mycoides* darstellte, zeigte allmählich einen Umschlag zu rauhem Wachstum. Nach einem Jahre wurden nur noch die typischen rankenförmigen Kolonien der Rauhform gebildet.

Genau das gleiche Verhalten zeigte der Stamm 46/M 8, der innerhalb 16 Monaten in die R-Form umschlug. Die Wachstumsgrenze ging bei dieser Kultur im Laufe der Zeit von 97,4 auf 99% r. D. zurück.

Demnach kann eine genaue Angabe des Hydraturminimums für diese Form nicht erfolgen. Die Werte schwanken zwischen etwa 97 und 99% r. D.

Auffallend ist der Unterschied gegenüber dem Befunde von WALTER (1924), der bei der Untersuchung des gleichen Organismus (Stamm KORDES, Berlin) noch bei 97% r. D. Wachstum feststellte. Eine Erklärung hierfür kann zur Zeit nicht gegeben werden (Glattform?).

Erwähnt muß hier noch eine Erscheinung werden, die nicht durch bestimmte Hydraturverhältnisse bedingt sein kann. Sie wurde bei einer großen Zahl der untersuchten aeroben Sporenbildner beobachtet. Es kommt häufig, vor allem bei Ausimpfung weniger, einzeln liegender Zellen, zu keinem Wachstum. Auch bei einer r. D., die normalerweise noch eine Entwicklung des betreffenden Organismus zuließ, war keine Teilung zu beobachten. Dagegen schien es mitunter, als würden die Zellen dessenungeachtet weiterhin peptonisierende Fermente ausscheiden, denn in ihrer Umgebung kam es zu einer Erweichung bzw. Verflüssigung der Gelatine. Waren jedoch in den Impftropfen Wuchsverbände zu mehreren zusammenliegender Bakterien vorhanden, so kamen die betreffenden Stufen regelmäßig zum Anwachsen. Es konnte dann der Fall sein, daß z. B. nur bei 98,2% r. D. Entwicklung auftrat, in allen übrigen Stufen, also auch bei 100 und 99% r. D., aber nicht. Eine Deutung dieses Befundes muß im Augenblick mangels genügend eingehender Untersuchungen unterbleiben. Erwähnt sei noch, daß bei asporogenen Organismen derartige Erscheinungen fast niemals, vereinzelt nur bei *Azotobacter* und *Bact. radiculicola*, beobachtet werden konnten.

Das Verhalten weiterer untersuchter Bakterienformen ist in Abb. 18 dargestellt.

#### *Wachstum von Hefen bei verschiedener relativer Dampfspannung.*

Die Methodik der Untersuchung war ganz die gleiche, wie sie oben für die Versuche mit Bakterien beschrieben worden ist. Als Nährboden

dienten durchweg Malzextraktmedien: 5% Malzextrakt, dazu je nach Bedarf 1,8% Agar bzw. 10% Gelatine.

Schon WALTER (1924), von dem die einzigen, mir bekannten Hydraturuntersuchungen mit der hier verwendeten Methode an Hefen stammen, betont die Schwierigkeiten einer exakten Messung des Wachstums bei diesen Organismen. Die gleichen Erfahrungen machte auch ich bei meinen Versuchen mit Hefen, weshalb auch hier nur eine Schätzung des relativen Wachstums nach den Angaben der Tabelle 2 erfolgte. Die besonderen morphologischen Beobachtungen an den einzelnen untersuchten Hefestämmen werden in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit eingehend behandelt.

### *Torula utilis.*

Stamm: Nr. 4719 Sammlungsstamm Geisenheim.

Ausgangskultur: 10 Tage altes Schrägröhrchen (Malzextraktagar), im Versuch wurde Malzextraktgelatine verwendet.

Das Verhalten dieser Form bei verschiedener r. D. entsprach etwa dem des *Bact. aerogenes*. Schon von 99% r. D. ab erfolgte eine deutliche Abnahme der Entwicklungsintensität und auch das Anwachsen war in den Stufen von 99 und 98,2% r. D. deutlich, von 97,4% r. D. ab sogar stark gehemmt. Die letzte Stufe, die eben noch Entwicklung erkennen ließ, lag bei 94,5% r. D. Darunter konnte niemals mehr Wachstum beobachtet werden. Die untere Grenze der Hydratur für die Entwicklung liegt demnach bei etwa 94% r. D.

### *Rhodotorula spec.*

Stamm Nr. 4044 aus Luft isoliert 1940.

Ausgangskultur: 14 Tage altes Schrägröhrchen (Malzextraktagar), im Versuch wurde Malzextraktgelatine verwendet.

Diese Form erwies sich als überaus unempfindlich gegen niedere r. D. In den ersten 3 Stufen bis 98,2% r. D. konnte überhaupt kein nennenswerter Unterschied beobachtet werden (Abb. 8). Die weiteren Stufen von 97,5 bis 95,4% r. D. zeigten zwar etwas schwächere Entwicklung, erreichten jedoch binnen etwa 3 Tagen den gleichen Stand wie die Stufen höherer r. D. Von 94,5% r. D. an war zwar das Anwachsen deutlich gehemmt, doch war bis zu 91,5% r. D. hinunter nach einigen Tagen die Entwicklung auch hier kaum merklich untereinander zurückgeblieben. Erst bei 90,4% r. D. trat dauernde, stärkere Wachstumsverminderung ein und bei 89,4% r. D. war erst nach 12—14 Tagen Entwicklung bemerkbar, die jedoch auch weiterhin krüppelhaft blieb. Darunter trat kein Wachstum mehr auf. Der Grenzwert der Hydratur liegt demnach bei etwa 89% r. D.

### *Endomyces vernalis.*

Stämme: Nr. 40151 Sammlungsstamm Berlin, Nr. 4711 von H. RAAF aus Birkensaft isoliert 1938, Nr. 4713 Sammlungsstamm Techn. Hochschule Wien.



Jeweilige Ausgangskultur: 12 Tage altes Schrägröhrchen (Malzextraktagar), im Versuch wurde Malzextraktgelatine verwendet.

Alle untersuchten 3 Stämme erwiesen sich, wie zu erwarten, als sehr widerstandsfähig gegen niedere r. D.-Werte. Innerhalb der ersten 5 Stufen bis 96,5% r. D. trat fast keine merkliche Entwicklungshemmung ein. Eine solche machte sich erst von 95,4% r. D. an abwärts bemerkbar,

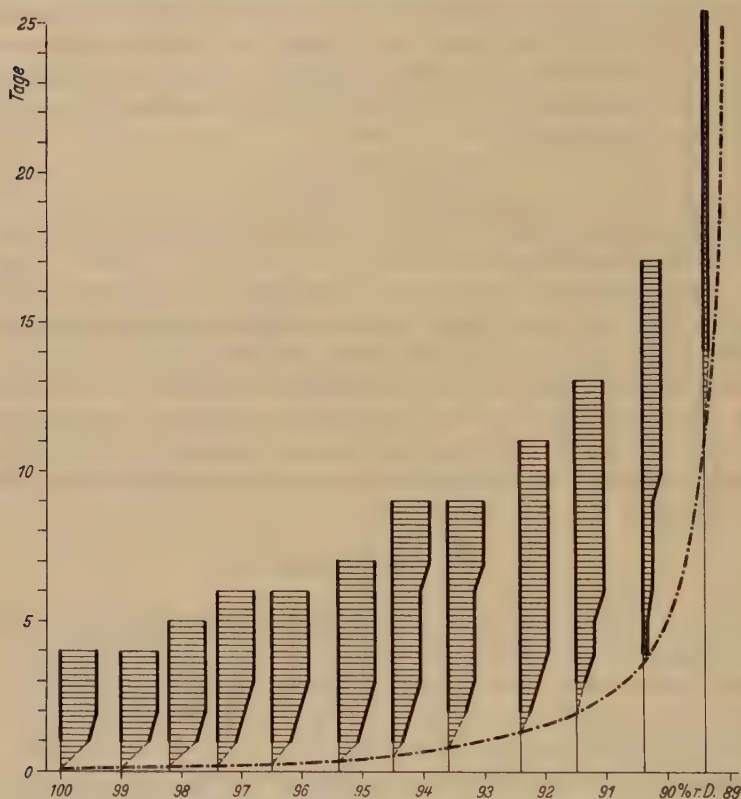


Abb. 8. *Rhodotorula spec.* („Rosahefe“).

wurde bei 93,6% r. D. stärker, um bei 89,4% r. D. ihr Maximum zu erreichen. Auch hier scheint jedoch mehr das Anwachsen als der endgültige Entwicklungszustand beeinträchtigt zu werden. Nach 14 bis 16 Tagen waren die bei 91,5 und die bei 89,4% r. D. gewachsenen Kolonien nicht wesentlich voneinander verschieden.

Die untere Grenze des Wachstums lag bei 89,4% r. D., Stamm 4711 zeigte mitunter auch noch bei 88% r. D. nach 3—4 Wochen ganz schwache Entwicklungserscheinungen. Die Grenzhhydratur für das Wachstum liegt demnach für diese Form bei etwa 89—88% r. D.

*Oospora lactis.*

Stämme: Nr. 477 aus Sauermilch isoliert 1937, 4003 aus Sauerkraut isoliert 1940.

Jeweilige Ausgangskultur: 10 Tage altes Schrägröhrchen (Malzextraktagar), im Versuch wurde Malzextraktgelatine verwendet.

Die Untersuchung dieses zum Vergleich herangezogenen „Milchsimmels“ von unsicherer systematischer Stellung ergab, daß er in bezug auf seine Trockenresistenz fast den widerstandsfähigsten Hefenformen gleichkommt. Von 97,4% r. D. ab zeigte er allerdings in den ersten Tagen eine stärkere Hemmung und blieb auch von etwa 93,6% r. D. an abwärts dauernd stark hinter den oberen Stufen zurück. Die Grenzwerte für die Entwicklung lagen bei Stamm 4003 bei 90,4, bei Stamm 477 bei 89,4% r. D. Der Grenzwert der Hydratur liegt also etwa bei 90—89% r. D.

Das Verhalten weiterer Hefestämme ist in Abb. 18 dargestellt.

**Konstanz des Verhaltens bei verschiedener relativer Dampfspannung.**

Die experimentelle Behandlung dieser Frage erscheint für die Beurteilung des unterschiedlichen Verhaltens der einzelnen Mikroorganismen von besonderer Bedeutung. Es wurde hierzu so vorgegangen, daß längere Zeit hindurch immer wieder die gleichen Stämme geprüft wurden.

Diese sich über rund 8 Jahre erstreckenden Beobachtungen zeigten eindeutig, daß die Konstanz des Verhaltens gegenüber niederen r. D.-Werten außerordentlich groß ist. Im Vergleich zu vielen anderen, oft stark variierenden Eigenschaften von Mikroorganismen kann daher der Grad der Resistenz gegen größere Trockenheit des Substrates als *konstante Eigenschaft, zumindest des jeweiligen Stammes*, angesehen werden. Von einer *Artkonstanz* zu sprechen, erscheint mir auf Grund der vorliegenden, immer noch an einer zu geringen Zahl von Einzelstämmen durchgeführten Versuche allerdings verfrüht. Immerhin zeigen die bisherigen Ergebnisse, daß nur bei wenigen Spezies stoffwechselphysiologisch gleiche Typen sich gegen verschiedene r. D. unterschiedlich verhalten. Meist stimmt das Wachstum der einzelnen Stämme wenigstens im Typus miteinander überein, und die Grenzwerte der Hydratur für das Wachstum sind wenigstens größenordnungsmäßig gleich.

Wo sich Ausnahmen hiervon zeigen (Tab. 3), haben wir es fast immer mit Arten zu tun, deren Vertreter auch in anderer Hinsicht als besonders variabel bekannt sind, wie die Typen der *Coli*-Gruppe, die Formen des *Bact. radicola* sowie die einzelnen Stämme von *Pseudomonas pyocyanea*. Auch die Sporenbildner sind hierher zu zählen, von denen gerade die große Variabilität des *Bacillus mycoides* häufig in der Literatur erwähnt ist (vgl. DOOREN DE JONG, 1933).

Demgegenüber könnte man einwenden, ich hätte vielfach mit lange in künstlicher Kultur gezogenen Stämmen gearbeitet und es wäre fraglich,

Tabelle 3.  
Verhalten verschiedener Mikroorganismen in längeren Zeitalständen mit schwankenden und konstanten Grenzwerten der Hydratur in % r. D. Auswahl von 53 untersuchten Stämmen.

Organismen-Stamm	1940	1941	1943	1944	1946	1947	1948
<i>Bacterium coli</i> (4012) .....	96,5	96,5	—	95,4	—	96,5	—
<i>Bacterium radicicola</i> (402)* .....	97,4	97,4	96,5	97,4	—	—	—
„ (4076)* .....	98,2	97,4	98,2	98,2	—	98,2	—
„ (4311)* .....	—	—	—	96,5	—	97,4	—
<i>Bacillus mesentericus</i> (4032) .....	96,5	95,4	96,5	96,5	—	—	—
„ (43118) .....	—	—	95,4	95,4	—	95,4	—
„ (4307) .....	—	—	95,4	96,5	—	—	—
<i>Bacillus mycoides</i> (4022)* .....	99	99	99	99	—	—	—
„ (4030)* .....	98,5	99	98,5	98,5	—	—	—
„ (46/M1)* .....	—	—	—	—	99	98,5	99
„ (46/M8)* .....	—	—	—	—	97,4	98,5	99
„ (4739)* .....	—	—	—	—	—	98,5	99
„ (4 xx)* .....	—	—	—	—	97,4	98,5	99
<i>Endomyces vernalis</i> (4711) .....	89,4	88	89,4	—	—	—	89,4
<i>Torula utilis</i> (4719) .....	94,5	94,5	—	94,5	—	—	94,5
„Rosahefe“ (4044) .....	89,4	89,4	—	89,4	—	89,4	89,4
<i>Schizosaccharomyces Jorgensohnii</i> (4729) .....	93,6	93,6	—	93,6	—	93,6	—
<i>Zygosaccharomyces polymorphus</i> (4730) .....	90,4	90,4	—	90,4	—	—	90,4

\* Wegen der auch innerhalb eines Jahres auftretenden Schwankungen des Grenzwertes bei diesen Stämmen wurde hier das mittlere Verhalten bei 5—10 Versuchen in dem jeweiligen Jahre angeführt.

ob sich unter natürlichen Bedingungen dieselben Mikroorganismen nicht ganz anders verhielten. Eine Anpassung an die besonderen, stabilen Kulturbedingungen wäre ja immerhin denkbar, wenn man dann auch erwarten müßte, daß das Verhalten der einzelnen Spezies untereinander sich mehr angleichen müßte als dies tatsächlich der Fall ist, wie aus den vorigen Kapiteln hervorgeht.

Um einer Klärung dieser Frage näherzukommen, wurde weiterhin untersucht die

### Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen an bestimmte relative Dampfspannung.

Die ausgewählten Stämme wurden bei 3 Stufen verschiedener r. D. gezüchtet: bei 100% r. D., bei einer mittleren r. D. und bei der Stufe, die zwar noch gutes, aber doch stark gehemmtes Wachstum zeigte. Beim Weiterführen der Kulturen wurde das Deckglas abgehoben, direkt davon auf den frischen Nährboden übertragen und das so beimpfte neue Deckgläschen über die gleiche feuchte Kammer gelegt und abgedichtet. Als Kulturgefäße dienten etwas größere Schälchen mit zurechtgeschnittenen, klargewaschenen Fotoplatten. Die Nährbodentropfen wurden entsprechend größer angefertigt.

Nach einiger Zeit wurde dann von jeder der 3 Stufen eine Aufschwemmung hergestellt und damit eine vollständige Versuchsserie nach Tab. 1 angesetzt.

In den Tab. 4 und 5 ist das Verhalten zweier Stämme als Beispiel für insgesamt 35 derartige Versuchsserien wiedergegeben.

Tabelle 4.

Versuchsstamm: *Bact. prodigiosum* (398).

Dauerkultur I bei 100%, II bei 98,2%, III bei 96,5% r. D. gehalten.

Dauer der Vorkultur	Überimpft	Dauerkultur	Wachstumsverlauf	Grenzwert in % r. D.
30 Tage	3 ×	I	normal	95,4
		II	normal	95,4
		III	bei 96,5 u. 95,4% r. D. 2 Tage früher angewachsen als bei I u. II	95,4
60 Tage	6 ×	I	normal	95,4
		II	normal	95,4
		III	wie nach 30 Tagen	95,4
3 Monate	10 ×	I	normal, die letzten 3 Stufen sehr schwach	95,4
		II	normal	95,4
		III	Wachstum bei 96,5 und 95,4% r. D. deutlich besser als normal	95,4
6 Monate	20 ×	I	wie nach 3 Monaten	95,4
		II	normal	95,4
		III	wie nach 3 Monaten	95,4



Tabelle 5.

Versuchsstamm: *Endomyces vernalis* (40151).  
 Dauerkultur I bei 100%, II bei 96,5%, III bei 91,5% r. D. gehalten.

Dauer der Vorkultur	Überimpft	Dauerkultur	Wachstumsverlauf	Grenzwert in % r. D.
30 Tage	2 ×	I	normal	89,4
		II	normal	89,4
		III	normal	89,4
60 Tage	4 ×	I	normal	89,4
		II	normal	89,4
		III	von 94,5% r. D. abwärts stärkeres Wachstum	89,4
3 Monate	6 ×	I	von 97,4% r. D. ab vielleicht etwas schwächeres Wachstum	89,4
		II	normal	89,4
		III	wie nach 60 Tagen	89,4
6 Monate	12 ×	I	von 97,4% r. D. ab deutlich schwächeres Wachstum	90,4
		II	normal	89,4
		III	wie nach 60 Tagen	89,4

Ganz ähnliche Resultate ergaben gleiche Versuchsreihen mit anderen Stämmen. Eine eindeutige Anpassung an eine niedrigere r. D. fand also innerhalb eines halben Jahres niemals statt. Diese Ergebnisse stimmen völlig mit den Befunden von HEINTZELER (1939) überein, die bei allerdings weniger langer Dauerkultur von Schimmelpilzen bei niedriger r. D. ebenfalls keine Anpassungserscheinungen erhielt.

Häufig zeigte sich zwar in meinen Versuchen ein besseres Wachstum nach längerer Zucht auf trockenerem Substrat in den Stufen mit geringerer r. D., während andererseits mitunter die bei hoher r. D. gehaltenen Linien eine geringere Resistenz aufwiesen, was sich z. T. sogar in einer Grenzwerthöhung ausdrückte (Tab. 5 nach 6 Monaten!). Wurde jedoch von diesen Kulturen auf Schrägagar überimpft und von diesem nach einigen Tagen erneut die üblichen Serien angelegt, so verhielten sich die Stämme in fast allen untersuchten Fällen völlig normal. Nur vereinzelt war eine zweite Übertragung auf Schrägagar notwendig. Die Deutung dieser Erscheinungen als *vorübergehende Modifikationen* erscheint demnach berechtigt.

#### Parallelversuche mit Salzlösungen und Änderung der relativen Dampfspannung.

Unter natürlichen Bedingungen sind die Hydraturverhältnisse der Umwelt von Mikroorganismen nur unter besonderen Umständen aus-

schließlich von der Wasserdampfsättigung des Luftraumes abhängig. Dies wird z. B. der Fall sein bei der Lagerung von Lebensmitteln in feuchten Räumen, vielfach auch im Boden, dann bei epiphytisch lebenden Mikroorganismen, soweit sie nicht, wie etwa die Nektarhefen in verborgen liegendem Nektar, weitgehend von der Außenwelt abgeschlossen sind. Meistens wird die Hydratur des Nährmediums in der Natur auch oder sogar vorwiegend von gelösten osmotisch wirksamen Substanzen abhängen; z. B. von Salzen (Bodenlösung, Brackwasser, Seewasser, Salinen, eingesalzene Lebensmittel usw.) oder von Zucker (Blütennektar, Narbensekret, pflanzliche Wundsekrete, Most, Honig usw.). Es sollte daher auch geprüft werden, ob das Wachstum eines Bakterienstammes gleich verläuft bei Veränderung der r. D. einerseits und bei Änderung des osmotischen Wertes der Nährlösung durch Salzzusatz andererseits.

Nach den Angaben von KOSTYTSCHEW (1926, Bd. 1, S. 256) wurde die äquilibrierte Salzlösung nach VAN T'HOFF hergestellt, nur wurde sie vierfach konzentriert angesetzt. Abgestufte Mengen dieser Lösung wurden einer ebenfalls vierfach konzentrierten Nährbouillon bzw. Nähragar zugefügt und mit soviel dest. Wasser aufgefüllt, daß Lösungen gleichen Nährstoffgehaltes, aber verschiedener Salzkonzentration erhalten wurden. Die osmotischen Werte wurden kryoskopisch ermittelt und nach den Tabellen von WALTER (1936) NaCl-Lösungen gleicher Atmosphärenwerte hergestellt, die zur Füllung der feuchten Kammern dienten. Auf diese Weise wurden Parallelserien mit je 8 Stufen angesetzt, deren einzelne Daten in Tabelle 6 zusammengestellt sind.

Tabelle 6.

Atmosphärenwerte der Nährböden + Salzlösung und entsprechende r. D.-Werte bei 20° C.

Stufe	Atm.	% r. D.	Stufe	Atm.	% r. D.
A	2,3	99,8	E	80	94,2
B	23	98,3	F	115	91,7
C	42	96,9	G	135	90,3
D	59	95,7	H	162	88,5

Eine völlig gleiche, quantitative Beurteilung des Wachstumsverlaufes war natürlich nicht möglich; dazu waren die Kulturbedingungen zu uneinheitlich. Die r. D.-Reihen wurden wie oben geschildert angesetzt, die Versuche mit Nährlösung und Salz in Reagenzröhrchen, die Reihen mit Nähragar und Salz in PETRISchalen, die mit einer Glasplatte und Vaseline vor Verdunstung geschützt waren, angelegt. Die Beimpfung der r. D.-Reihen erfolgte in der bereits oben angegebenen Weise: in die Bouillonröhrchen wurde je 1 Tropfen der Ausgangskulturaufschwemmung eingetropft, auf den Agarplatten wurde je 1 Normalöse mit dem DRYGALSKI-Spatel gleichmäßig verteilt. Durch laufende mikroskopische Kontrollen wurde der Beginn der Entwicklung bestimmt, dann aber auch wie früher die Intensität des Wachstums abgeschätzt. Die folgenden Kurven geben geglättete Mittelwertskurven aus etwa je 3—6 Versuchen wieder. Die Einzelwerte wurden nicht eingetragen, um die Klarheit nicht zu beeinträchtigen, andererseits sollte keine Genauigkeit vor-

getäuscht werden, die der Natur der Objekte und der Methodik nach gar nicht vorhanden sein kann. Immerhin waren Abweichungen von Einzelwerten von der Kurve, die größer waren als 1% r. D., äußerst selten. Ebenfalls aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in den graphischen Darstellungen nur der Beginn der Entwicklung verzeichnet. Aus einer größeren Reihe von untersuchten Mikroorganismen seien hier nur 5 besonders eingehend geprüfte Stämme herausgehoben. Bei weiteren 11 untersuchten Stämmen lagen bei 4 die Grenzwerte im Salzmedium höher, bei 5 Stämmen gleich hoch und bei 2 niedriger als bei den Parallelreihen bei verschiedener r. D.

*Bact. prodigiosum* (Stamm 4745).

Das Anwachsen war bis etwa 96% r. D. in allen drei Serien gleich. Die r. D.-Reihe zeigte darauf den üblichen Anstieg, der Verzögerung des

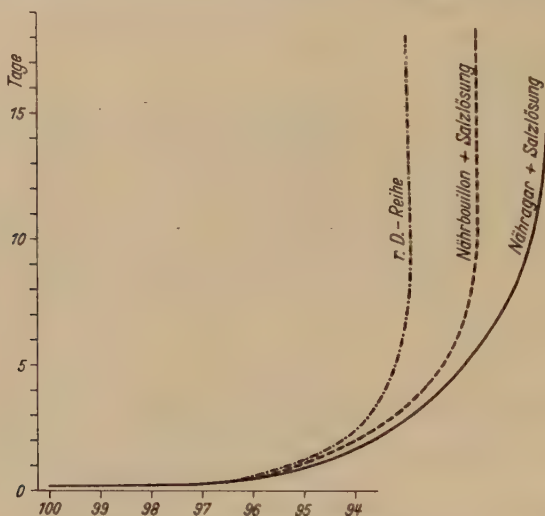


Abb. 9. *Bact. prodigiosum*, Stamm Nr. 4745.

Anwachsens entsprechend. In der Nährlösung + Salz erfolgte dagegen noch bis ungefähr 92%, auf Nähragar + Salz bis etwa 91% r. D. Wachstum. Der Unterschied zwischen den Grenzwerten von Lösung + Salz und Agar + Salz kann jedoch nicht als gesichert gelten, weil eine sehr schwache Entwicklung in Bouillon natürlich viel schwerer zu beobachten ist als auf Nähragar, auf dem mikroskopisch noch die geringsten Wachstumserscheinungen (Mikrokolonien) festgestellt werden können. Die Grenzwerte für Salznährböden liegen hier also um etwa 3—3,5% r. D. tiefer als für die Methode der Veränderung der r. D. (vgl. Abb. 9).

*Pseudomonas tumefaciens* (Stamm 476)

zeigte ein ähnliches Verhalten, wenngleich hier, früheren Befunden in r. D.-Serien entsprechend, die Grenzwerte im ganzen höher lagen als bei *Bact. prodigiosum*. Der Unterschied entsprach etwa 1,5% r. D.

*Bac. mycoides* (Stamm 4739)

erwies sich im Vergleich zu seiner außerordentlichen Empfindlichkeit gegen eine Erniedrigung der r. D. als wesentlich resistenter gegenüber einem Salzzusatz zum Nährsubstrat von gleichem Atmosphärenwert (Abb. 10). Während bei 99% r. D. in der feuchten Kammer kein Wachstum mehr erfolgte, trat bei Salzzusatz entsprechend einer r. D. von etwa 98,5% (Bouillon) bzw. 96,5% r. D. (Agar) noch Wachstum auf. Der Unterschied beträgt also bis zu 3% r. D. Auch hier gilt für die in Bouillon und Agar gefundenen unterschiedlichen Grenzwerte das bei *Bact. prodigiosum* Gesagte.

*Bac. subtilis* (Stamm 4740)

zeigte sich wesentlich empfindlicher gegen Salz als die vorige Art (Abb. 11). Während er bei 95% r. D. in den r. D.-Serien noch Wachs-

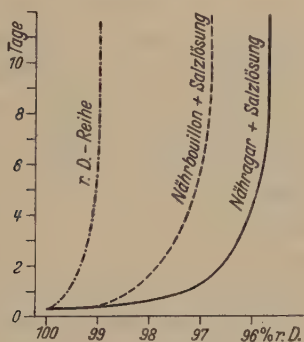


Abb. 10. *Bac. mycoides*, Stamm Nr. 4739.

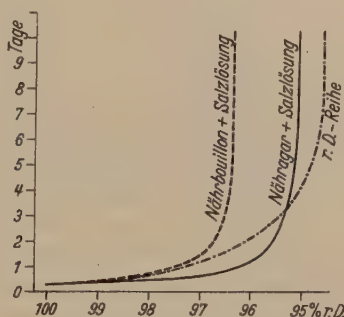


Abb. 11. *Bac. subtilis*, Stamm Nr. 4740.

tum aufwies, blieben die entsprechenden Stufen der Salz-Medien schon steril. Die Grenzwerte für die Salz-Serien lagen hier also um etwa 2% r. D. (Bouillon) bzw. 0,5% r. D. (Agar) höher als die der feuchten Kammern.

*Pseudomonas pyocyanea* (Stamm 4742).

Die Grenzwerte für die Salz-Serien waren hier bei Bouillon und Agar gleich, lagen aber erheblich (etwa 2% r. D.) über dem mit der r. D.-Methode ermittelten Wert.

Auch HEINTZELER (1939) hatte Parallelversuche mit Schimmelpilzen und äquilibrierter Salzlösung durchgeführt. Im Gegensatz zu ihren Befunden, bei denen die Grenzwerte der Salzversuche immer höher lagen (bis 6%) als die auf verschieden feuchtem festem Substrat, zeigten meine Untersuchungen mit verschiedenen Bakterienstämmen ein unterschiedliches Verhalten. Die Grenzwerte in Salzsubstraten waren 1. niedriger (bis 4% r. D.) (*Bact. prodigiosum*, *Bac. mycoides*), 2. etwa gleich hoch



(*Pseudom. tumefaciens*, *Bac. subtilis*) und 3. höher (bis 2% r. D., *Ps. pyocyanea*) als die durch die r.-D.-Methode ermittelten. Eine Deutung dieser Befunde wird im letzten Kapitel dieser Arbeit versucht.

Zunächst soll noch auf einige

#### morphologische Beobachtungen<sup>1</sup>

eingegangen werden, die im Verlaufe der geschilderten Untersuchungen gemacht wurden.

Die Kolonieform bei Bakterien zeigte, wie zu erwarten war, oft eine starke Veränderlichkeit unter dem Einflusse verschieden hoher r. D., die ja ihrerseits die Konsistenz des Nährmediums beeinflusst. Dabei erwiesen sich aber beide Faktoren: 1. die r. D. und 2. die Eigenart des jeweiligen Stammes für das Auftreten besonderer Kolonieformen verantwortlich.

Die Veränderlichkeit der Kolonieform unter dem Einfluß verschiedener r. D. konnte bei fast allen untersuchten Bakterien-Stämmen beobachtet werden. Z. T. ist das auftretende Bild aber auch vom jeweiligen Entwicklungszustand der Kolonie abhängig. Ist das Wachstum aber durch eine erniedrigte r. D. verlangsamt, so kann es vorkommen, daß die bei niedrigerer r. D. entstandenen Kolonien zwar langsamer, aber doch alle Stufen und Formen der bei höherer r. D. gewachsenen Kolonien durchlaufen. Am wenigsten ausgeprägt ist meistens die Form der bei 100% r. D. gewachsenen Kolonie, was zweifellos mit der halbstarren Konsistenz des stark gequollenen Gelatinetropfens zusammenhängt. Zwischen 99 und etwa 96% r. D. zeigen dann die Gelatine-Kolonien die stärkste individuelle, d. h. stammeseigene Variabilität. Gegen das Hydraturminimum zu tritt in der Regel dauernd stark gehemmtes Wachstum auf, was auch in einer weniger ausgeprägten charakteristischen Form der Kolonien zum Ausdruck kommt.

Eine auffallende Abweichung hiervon wurde bei dem „Bakterien“-Stamm *Mycobact. siliacum* festgestellt, der bei 100% r. D. innerhalb weniger Tage schöne Mycelbildung zeigte und damit zusammenhängend deutlich strahlige Kolonien ausbildete. Bei niedrigerer r. D. kam es dagegen nur zur Bildung kurzer Strahlen am Rande der Kolonien.

Auch auf die Morphologie der Bakterienformen selbst ist die r. D. nicht ohne Einfluß. Der größte Teil der Protokolle sowie zahlreiche Mikroaufnahmen sind leider durch Kriegseinwirkung verloren gegangen, doch sei das besonders auffällige Verhalten eines aus der Rhizosphäre von *Tussilago farfara* isolierten, der *Radio-bacter*-Gruppe nahestehenden Stäbchens, das gelegentlich anderer Untersuchungen (BURCIK, 1940) in Kultur genommen wurde, näher besprochen. Die Kultur zeigte von 99% r. D. ab starke Hemmung, bei 100% r. D. innerhalb von 7 Tagen Verflüssigung des ganzen Nährbodentropfens; der Grenzwert des Wachstums lag bei

<sup>1</sup> Interessenten kann eine Kollektion von 75 Mikroaufnahmen vom Verf. zur Einsichtnahme zur Verfügung gestellt werden.

etwa 94% r. D. Nach 10tägigem Wachstum wurden Ausstrichpräparate der einzelnen Stufen hergestellt und mit Methylenblau gefärbt. Das Ergebnis ist in Tab. 7 wiedergegeben.

Tabelle 7.  
Morphologie von Stamm „*Tu 12*“ auf Bohnengelatine, 10 Tage bei 20° C.

Stufe	% r. D.	Morphologie (Methylenblaufärbung)
I	100	kokkenförmige, unterschiedlich färbbare Formen, 1—1,2 $\mu$ groß
II -	99	kokkenförmige Kurzstäbchen, gut färbbar, 0,5—0,7 $\times$ 0,9—1,3 $\mu$ groß
III	98,2	Kurzstäbchen, gut färbbar, 0,5—0,7 $\times$ 1—1,5 $\mu$
IV	97,4	Kurzstäbchen, gut färbbar, 0,5—0,7 $\times$ 1—2 $\mu$
V	96,5	Kurzstäbchen, gut färbbar, 0,6—1 $\times$ 1,5—3 $\mu$
VI	95,4	Langstäbchen, zum Teil leicht gekrümmt, unregelmäßig färbbar, 1—1,2 $\times$ 2—4 $\mu$
VII	94,5	typische Involutionsformen von unregelmäßiger Gestalt und Färbbarkeit, bis zu 3 $\times$ 14 $\mu$ groß

Ein so starkes Variieren unter dem Einfluß verschiedener r. D. wurde indessen bei keinem anderen Bakterienstamm wieder gefunden. Häufig waren aber weniger krasse morphologische Abweichungen feststellbar, auf die im einzelnen jedoch hier nicht näher eingegangen werden kann.

Ein direkter Einfluß der r. D. auf die Gestalt der Bakterien scheint allerdings wenig wahrscheinlich. Durch die starke Austrocknung der Gelatinetropfen bei niederer r. D. werden natürlich die Diffusionsbedingungen schlechter, was leicht zu einer Anhäufung schädlicher Stoffwechselprodukte einerseits sowie zu einer Behinderung der Zufuhr neuer Nährstoffe zu den einzelnen Individuen andererseits führen kann. Beide Faktoren wurden aber bereits vielfach in der Literatur als die Ursache der Bildung besonderer, z. B. sogenannter teratologischer Wuchsformen nachgewiesen. Sie werden vermutlich auch bei der hier vorliegenden Versuchsanordnung die Hauptrolle spielen.

Dieselbe Verkettung einzelner Faktoren finden wir auch in bezug auf die Beweglichkeit bei verschiedener r. D. *Pseudomonas pyocyanea* Stamm 4013 und 44120 zeigten z. B. auch noch bei 99% r. D. nach 2 Tagen lebhafte Eigenbewegung, während Stamm 4309 nur bei 100% r. D. bewegliche Formen aufwies. Stamm 4742 endlich ließ häufig sogar noch bei 98,2% r. D. eine, wenn auch langsame Eigenbewegung erkennen. Maßgeblich war jedoch nicht das Verhalten der einzelnen Stämme gegen verschiedene r. D.-Werte, sondern die verschieden große Fähigkeit zur Gelatineverflüssigung, wie die Zusammenstellung in Tabelle 8 zeigt.

Tabelle 8.

Faktorenverkettung: Beweglichkeit — Gelatineverflüssigung — r. D. bei verschiedenen Stämmen von *Pseudom. pyocyanea* (20° C).

Stamm	Beweglichkeit bei r. D.			Gelatineverflüssg.
	100%	99%	98,2%	
4009	++	0	0	mäßig
44120	++	+	0	gut
4013	++	+	0*	gut
4742	++	+	(+)	sehr gut

\* Kein Wachstum!

Bei den Stämmen 44120 und 4013 war die Verflüssigung so intensiv, daß auch bei 99% r. D. der Gelatinetropfen verflüssigt wurde, bei Stamm 4742 sogar noch bei 98,2% r. D. Stamm 4009 hingegen zeigte so schwache Peptonisierung, daß nur in der ersten Stufe bei 100% r. D. die Gelatine eine für die Geißeltätigkeit genügende Verflüssigung erfuhr.

Einflüsse der r. D. auf die Morphologie von *Hefen* wurden bereits von WALTER (1924) beschrieben. Bei meinen Untersuchungen konnten diese Befunde bestätigt und erweitert werden. Die systematische Stellung der jeweiligen Form spielt für das Verhalten bei verschiedener r. D. eine ausschlaggebende Rolle. Es sind also auch hier innere formbildende Kräfte, die die Fähigkeit zur Reaktion auf äußere Einflüsse bedingen.

*Torula utilis* zeigte weder in bezug auf die Kolonieforn noch auf die der einzelnen Zellen auffällige Besonderheiten. Bei 100% r. D. erschienen die Individuen etwas länglicher als unter normalen Kulturbedingungen, bei etwa 97% r. D. war die normale *Torula*form vorherrschend, die in den letzten Stufen mit feststellbarem Wachstum z. T. durch blasig angeschwollene Zellen bis zu 3facher Größe abgelöst wurden.

Ganz ähnlich verhielt sich *Schizosaccharomyces Jørgensohnii*, deren Typus als „Spalthefe“ vor allem bei 97—96% r. D. besonders klar zutage trat.

*Zygosaccharomyces polymorphus* zeigte insofern eine interessante Abweichung, als bei hoher r. D. (bis 99% r. D.) sowie bei besonders niedriger r. D. (ab 96%) Kolonien mit ziemlich glattem Rand gebildet wurden, dazwischen jedoch, z. B. bei 98,2% r. D., nach einigen Tagen deutliche Sproßverbände am Rande der Kolonie zur Ausbildung kamen. Die Kolonien erhielten hierdurch einen gefransten Rand und unterschieden sich so ganz deutlich von den glattrandigen Kolonien höherer und niedrigerer r. D.

*Saccharomyces cerevisiae* bildete bei 100% r. D. Sproßverbände aus langen gestreckten Einzelzellen, die ihrerseits ebenfalls längliche Seitenzweige ansetzten (Abb. 12). Bei 98,2% r. D. erschienen die Sproßverbände selbst und auch deren einzelne Glieder bereits wesentlich kürzer,



was bei etwa 96% r. D. noch stärker zum Ausdruck kam. Von 94,5% r. D. abwärts kamen nur kugelförmige Zellen zur Ausbildung, wie sie Abb. 13 zeigt.

Ein von M. STEINER von eingemachten Rüben isolierter *Willia*-Stamm (*Willia spec.*, Nr. 4732) zeigte ein gleiches Verhalten in noch ausgeprägterer Form. Bei 100% r. D. wuchsen binnen 3 Tagen, strahlenförmig vom Zentrum ausgehend, septierte Zellfäden, denen kürzere Seitenzweige entsproßten, die ihrerseits wiederum Sprosse bildeten. In jeder weiteren Stufe waren die Sproßverbände sowie deren einzelne

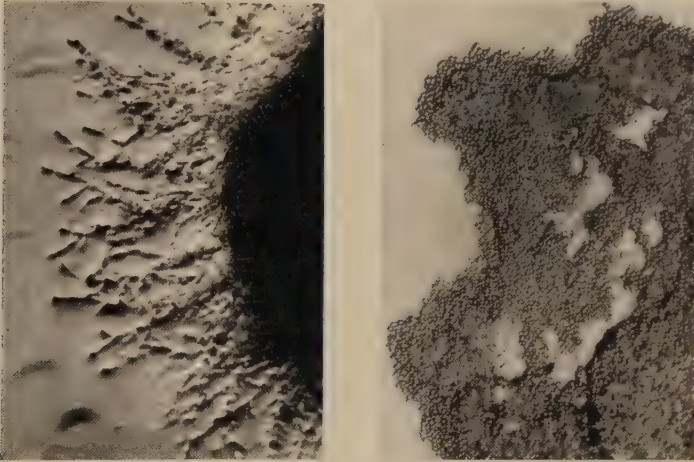


Abb. 12 u. 13. *Saccharomyces cerevisiae*, 3 Tage bei 100% und 94,5% r. D. (Vergr.: 150 mal)  
[Prot.-Nr. 489/492 — 47].

Glieder in den ersten 3—6 Tagen kürzer als in der nächsthöheren Stufe. Bei 93,6% r. D. wurden wiederum nur absolut rundliche Zellen gebildet. Nach einigen Tagen zerfielen dann die Verbände bei 100 und 99% r. D. in kurze Oidien bei gleichzeitiger starker Erweichung der Gelatine-tröpfchen, so daß die ursprünglich strahligen Ausläufer in dicke Wülste verwandelt wurden, die nur an einzelnen Stellen noch ihre Herkunft aus Sproßverbänden erkennen ließen. Bei mittlerer r. D. (z. B. 98,2%) hingegen waren nun reichverzweigte Sproßbäumchen entstanden, die allerdings wesentlich gedrungenere Seitenäste aufwiesen als die einige Tage früher bei 100 und 99% r. D. gebildeten Sproßbäumchen.

*Willia anomala* verhielt sich ähnlich. Die Mycelbildung war hier besonders deutlich. Wenn auch gewisse graduelle Unterschiede vorhanden waren, so war der Typus des morphologischen Bildes bei unterschiedlicher r. D. doch der gleiche wie von Stamm Nr. 4732.

*Endomyces vernalis* zeigte ein Verhalten, das in allen wesentlichen Punkten auffallend dem von *Oospora lactis* ähnelte. Die hier gegebene



Beschreibung gilt daher im großen ganzen für beide Formen, vielleicht mit geringen Verschiebungen am Ende der r. D.-Reihe, weil sich *Endomyces* meist als etwas resistenter gegenüber niedriger r. D. herausgestellt hat als *Oospora lactis*.

Bei 100 und 99% r. D. wurden raschwachsende, aus langen Zellen bestehende Mycelien gebildet, die, strahlig vom Zentrum der Kolonie

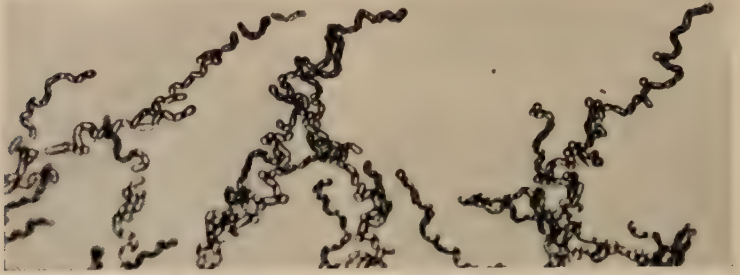


Abb. 14. *Endomyces vernalis*, 8 Tage bei 100% r. D. (Vergr.: 200mal) [Prot.-Nr. 617/48].

ausgehend, vielfach bald den Tropfenrand erreichten. Bis zu 93% r. D. hinunter beherrschte zwar das strahlige Wachstum das Bild der Kolonien, zeigte aber die Tendenz, mit abnehmender r. D. immer kürzere



Abb. 15 u. 16. *Oospora lactis*, 9 Tage bei 100% und 97,4% r. D. (Vergr.: 10mal) [Prot.-Nr. 501/502 — 47].

Zellen auszubilden. Bei 93% r. D. waren nur noch kurze, septierte Zellketten mit wenigen seitlichen Aussprossungen vorhanden. Nach wenigen Tagen begann dann der Zerfall des Mycels in Oidien (Abb. 14), der bei höherer r. D. rasch, bei jeder weiteren Stufe niedrigerer r. D. jeweils etwas verzögert auftrat. Diese Erscheinung drückte sich natürlich auch in der Kolonieform aus. Die außerordentlich lockeren Randausläufer der bei 100% r. D. gewachsenen Kolonien (Abb. 15) standen in jeder weiteren Stufe von niedrigerer r. D. dichter (Abb. 16). Der „pilzähnliche“ Eindruck verschwand daher mit abnehmender r. D. immer mehr, bis von etwa 93 bzw. 90% r. D. ab das Bild einer typischen Hefekolonie erreicht war.

*Endomyces Magnusii* zeigte im morphologischen Verhalten völlige Übereinstimmung mit *Endomyces vernalis* und weitgehende mit *Oospora lactis*. Bei einer r. D. zwischen 97 und 95% zeigte *Endomyces Magnusii* sehr auffälligen Drehwuchs (Abb. 17), der in etwas geringerem Grade auch bei verschiedenen anderen Hefen, vor allem bei den *Endomyces vernalis*- und *Oospora lactis*-Stämmen bei der gleichen r. D. auftrat.

Weitere noch laufende Untersuchungen an zahlreichen Hefestämmen sollen zeigen, ob den beobachteten morphologischen Ausbildungen bei verschiedener r. D. eine diagnostische Bedeutung für die praktische Hefe-Systematik zukommt.

### C. Besprechung der Ergebnisse.

Von den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen interessieren zunächst die Grenzwerte der Hydratur für das Wachstum. Eine Zu-

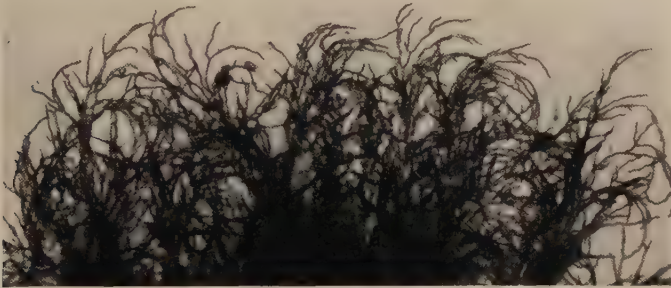


Abb. 17. *Endomyces Magnusii*, 15 Tage bei 96,5% r. D. (Vergr.: 70 mal) [Prot.-Nr. 627/47].

sammenstellung der gefundenen Werte enthält das Diagramm in Abb. 18, das auch gleichzeitig über das Ausmaß der Schwankungen sowie über die r. D. Auskunft gibt, bei der bereits eine dauernde Entwicklungshemmung eintritt.

Vergleichen wir die erhaltenen Daten mit den drei von WALTER (1931, S. 14) aufgestellten Gruppen von Mikroorganismen in bezug auf ihre Hydraturverhältnisse, so zeigt sich folgendes: In die Gruppe I = xerophile Arten (Minimum zwischen 90 und 85% r. D., stärkere Hemmung von 95% abwärts) gehören die „Rosahefe“ und *Endomyces vernalis*. *Micrococcus roseus*, *Zygosaccharomyces polymorphus*, *Oospora lactis* und eventuell auch *Saccharomyces cerevisiae* bilden den Übergang zur Gruppe II = mesophile Arten (Minimum zwischen 95 und 90% r. D., Hemmung von 98—97% abwärts). Zu dieser Gruppe gehören viele der bekannten saprophytischen Bakterienarten wie *Luftsarcinen*, *Pseudomonas iniqua*, *Mycobacterium siliacum*, vereinzelte Stämme von *Bact. coli* und *Bact. vulgare* sowie fast alle Hefen. An der Grenze der mesophilen Arten stehen Formen wie *Bact. prodigiosum*, *Bact. aerogenes*,

gewisse Stämme von *Pseudomonas pyocyanea* und *Bac. subtilis*, die zur Gruppe III = hygrophile Arten überleiten (Hydraturminimum bei 95% r. D. oder höher, Hemmung von 100% r. D. abwärts beginnend). Hier-

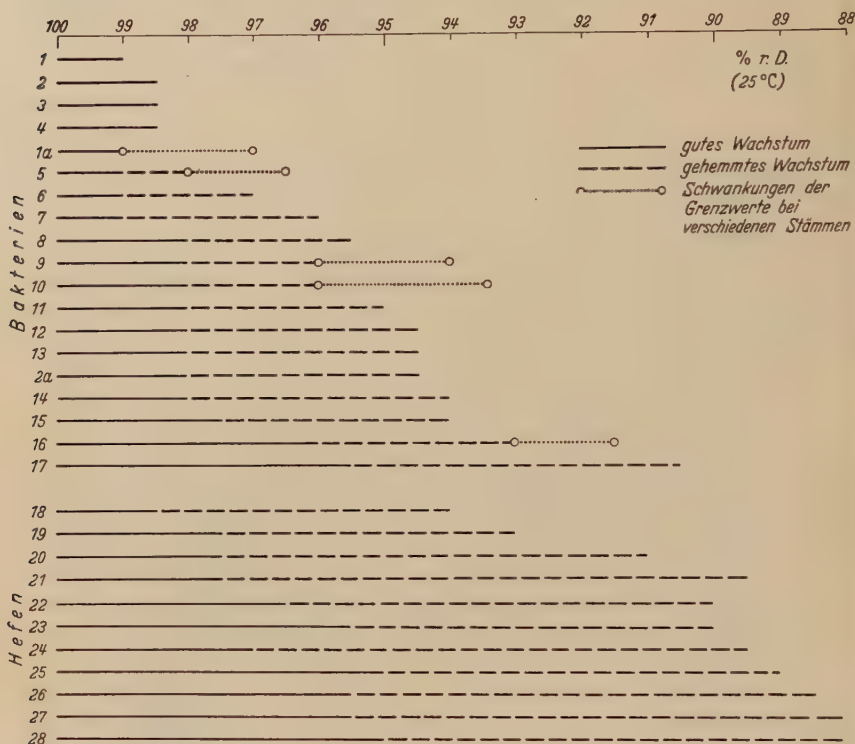


Abb. 18. Hydratur-Grenzwerte des Wachstums bei Bakterien und Hefen. Nachstehend in Klammern ( ) die Zahl der untersuchten Stämme.

- 1 *Bac. mycoides* (3), 1a *Bac. mycoides* (2), 2 *Pseudomonas pyocyanea* (1), 2a *Pseudomonas pyocyanea* (3), 3 *Bac. luteus* (2), 4 *Bac. asterosporus* (2), 5 *Bact. radicola* (3), 6 *Azotomonas insolita* (1), 7 *Pseudomonas tumefaciens* (3), 8 *Bac. mesentericus* (3), 9 *Bact. vulgare* (3), 10 *Bact. coli* (3), 11 *Bac. subtilis* (2), 12 *Bact. prodigiosum* (4), 13 *Bact. aerogenes* (4), 14 *Mycobact. silvaceum* (1), 15 *Pseudomonas iniqua* (1), 16 gelbe Luftsarazine (5), 17 *Micrococcus roseus* (3);
- 18 *Torula utilis* (1), 19 *Schizosaccharomyces Jörgensenii* (1), 20 *Willia spec.* (1), 21 *Saccharomyces cerevisiae* (3), 22 *Mycoderma cerevisiae* (1), 23 *Zygosaccharomyces polymorphus* (1), 24 *Oospora lactis* (2), 25 „Rosahefe“ (1), 26 *Endomyces Magnusii* (1), 27 *Willia anomala* (1), 28 *Endomyces vernalis* (3).

her zählen *Bac. mycoides*, Stämme von *Pseudomonas pyocyanea*, *Bac. luteus*, *Bac. asterosporus*, *Bact. radicola* u. a.

Wie jedes vom Menschen geschaffene Schema stellt auch diese Einteilung nur ein grobes System für das verschiedene Verhalten der Mikroorganismen bei unterschiedlicher r. D. dar. Die Abb. 18 zeigt, daß es zwischen diesen Gruppen eine lückenlose Reihe von Übergangsformen gibt.

Über die Konstanz des Verhaltens bei verschieden hoher r. D. kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen gesagt werden, daß sie,

wenigstens für jeden einzelnen Stamm, außerordentlich groß ist. Innerhalb einzelner Arten scheint wenigstens größenordnungsmäßig gleiches Verhalten die Regel zu sein. Ausnahmen hiervon machen auch sonst als sehr variabel bekannte Mikroorganismen, was deutlich aus der Zusammenstellung in Abb. 18 hervorgeht. Die festgestellte Konstanz des Verhaltens gegenüber einer bestimmten r. D. erscheint bei näherer Betrachtung auch keineswegs verwunderlich. Durch die hier angewendete r. D.-Methode wird ja, wie schon gesagt, auf rein physikalischem Wege eine verschiedene Trockenheit des Nährsubstrates herbeigeführt. Hierdurch wird aber ebenso rein physikalisch der Quellungszustand des Plasmas der untersuchten Mikroorganismen verändert (WALTER, 1924). Dieser Quellungszustand ist aber in bezug auf die Wachstumsfähigkeit der jeweiligen Form ausschließlich abhängig von der chemisch-physikalischen Zusammensetzung des Plasmas. Daß diese aber, wenigstens innerhalb eines Stammes und meistens wohl auch innerhalb einer Art, als konstant anzunehmen ist, scheint ebenso selbstverständlich, wie die daraus resultierende Konstanz des Verhaltens bei verschiedener r. D.

Dem entsprechen auch die Ergebnisse anderer Autoren, die sich mit dem „normalen osmotischen Wert“ oder dem „normalen intracellulären Druck“ bei pflanzlichen Mikroorganismen befaßten (BLAGOWESCHTSCHEWSKY und Mitarbeiter, 1926; MISCHUSTIN, 1936). Auf Grund ihrer Untersuchungen an Hefen kommen auch SELIBER und KATZNELSON (1927) zu dem Schluß, der osmotische Wert sei, wenn auch vom Nährboden abhängig, eher ein systematisches als ein ökologisches Kennzeichen. Mir scheint allerdings, im Hinblick auf die Fundorte mancher typischer xerotoleranter Formen, die folgende Formulierung besser den tatsächlichen Verhältnissen zu entsprechen: Weil der osmotische Wert primär ein systematisches Stigma einer Art ist, *kann* er auch zu einem ökologischen Merkmal werden, wenn der Organismus in einem Milieu lebt, das seinem osmotischen Wert entspricht. Neben diesem „Eigenwert“ ist aber auch die Toleranz der jeweiligen Art gerade für ökologische Gesichtspunkte wesentlich.

Damit wird auch der Einwand von MISCHUSTIN (1936) gegen die von verschiedenen Autoren benutzten Methoden, z. B. auch gegen die hier verwendete, hinfällig. Die meisten Untersuchungen, darunter auch die vorliegenden, sollten ja ergeben, unter welchen Außenbedingungen in bezug auf die osmotischen Verhältnisse Mikroorganismen noch lebensfähig sind, während MISCHUSTIN den „arteigenen intracellulären Druck“ bestimmt. Beide Fragestellungen sind systematisch und ökologisch von Interesse, hier sollte jedoch nur die erste behandelt werden.

Wie schon eingangs betont, wurden die osmotischen Bedingungen in früheren Untersuchungen meistens durch Zusatz von Zucker oder Salzen zu den Nährmedien verändert. Vergleichen wir zunächst die mit



Zuckerzusatz erzielten Ergebnisse mit den durch Veränderung der r. D. gewonnenen, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung, wie dies schon WALTER (1931, S. 15) und HEINTZELER (1939, S. 124) feststellten. Leider enthalten viele frühere Mitteilungen über osmophile Hefen, worauf schon KROEMER und KRUMBHOLZ (1931) hinwiesen, oft sehr mangelhafte, ja sogar völlig unbrauchbare Angaben über die Zuckerkonzentration der verwendeten Nährlösungen. Immerhin zeigt sich doch wenigstens größenordnungsmäßig eine hinreichende Übereinstimmung mit den hier auf festem Substrat bei verschiedener r. D. ermittelten Grenzwerten. (Vgl. die Angaben bei LAURENT, 1890; LINDNER, 1894; KOHL, 1908; v. D. HEIDE, 1911; MEISSNER, 1920; SATAWA, 1920; KLÖCKER, 1924 u. a.) Über die weite Verbreitung und die speziellen Standorte osmophiler Sproßpilze berichten die umfangreichen Arbeiten von KROEMER und KRUMBHOLZ (1931), KRUMBHOLZ (1931a und b), KARAMBOLOFF und KRUMBHOLZ (1931) sowie KROEMER und KRUMBHOLZ (1932).

Darin finden sich auch wertvolle Angaben über das Verhalten der gleichen Stämme bei Zusatz verschiedener Neutralsalze zur Nährlösung (KROEMER und KRUMBHOLZ, 1932, S. 387). Die dabei ermittelten Grenzkonzentrationen zeigen auffallende Abweichungen und bringen neue Belege für das schon vielfach festgestellte unterschiedliche Verhalten von Mikroorganismen gegenüber Neutralsalzen.

Wir haben es eben hier nicht mehr allein mit einer Frage des Wasserhaushaltes zu tun, sondern es kommt die jeweils anders ausgeprägte chemische, bzw. physiko-chemische Wirkung der Elektrolyte hinzu. In den einschlägigen Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Wachstumsgrenze in Nährsubstrat + Salz entweder höher, gleich oder auch niedriger liegen kann als bei gleicher Veränderung der r. D. auf salzfreiem Medium. Es ist also hier nicht ausschlaggebend, welche osmotischen Werte ein Organismus vertragen kann, bzw. welche ihm noch eine Entwicklung gestatten, sondern die Verträglichkeit des jeweiligen Salzes ist für das Verhalten des betreffenden Stammes verantwortlich.

Wir müssen demnach eine Aufnahme der osmotisch wirkenden Elektrolyte in das Zellinnere annehmen, was ja wohl auch für Zucker gelten dürfte, wobei bei letzterem aber natürlich keine spezifische Wirkung von Anion und Kation zur Geltung kommt. Dies dürfte auch der Grund sein für die viel größere Anpassungsfähigkeit an höhere Salzgehalte einerseits als an größere Zuckerkonzentrationen und niedere r. D.-Werte andererseits. Schon LAURENT (1890) berichtet von einer Bierhefe, die sich an 20—25%ige  $\text{KNO}_3$ - und 29%ige  $\text{NaCl}$ -Lösungen gewöhnen ließ. Dabei trat jedoch auch eine Gewöhnung an die zur Erhöhung des osmotischen Wertes verwendete Substanz ein! Gleiches gilt auch für die

zahlreichen anderen Versuche, Mikroorganismen einem höheren Salzgehalt des Substrates anzupassen (ERRERA, 1899; RACIBORSKY, 1905; HOF, 1935 u. a.).

Das Problem der halophilen Mikroorganismen gewinnt, so betrachtet, eine andere Bedeutung: Das Schwerkgewicht verlagert sich von der physikalischen (Osmose!) nach der physiko-chemischen Seite (Ionenwirkung!). Dann werden auch einander widersprechende Angaben über halophile Mikroorganismen und deren Herkunft verständlicher (HOF, 1935; SCHOOP, 1935; MISCHUSTIN, 1936).

Diese Überlegungen sollten auch in einer strengeren, sinngemäßen Terminologie ihren Niederschlag finden, so daß nicht weiter unter gleichen Bezeichnungen völlig verschiedene Faktoren zusammenge-  
worfen werden:

I. Von *Xerophilie* (Mesophilie, Hygrophilie) sollte man nur dann sprechen, wenn es sich um ein Verhalten von Mikroorganismen handelt, das ausschließlich vom Faktor Wasser abhängig ist; also bei Veränderung der r. D.

II. Die Ausdrücke *Osmophilie* (Osmotoleranz usw.) sollten nur dann verwendet werden, wenn Veränderungen des osmotischen Wertes unter dem Einfluß chemisch neutraler osmotisch wirksamer Mittel vorliegen. Wo hierbei zudem noch von seiten des Organismus einem bestimmten Stoff der Vorzug gegeben wird, könnte dieser in die Termini mit einbezogen werden (z. B. Saccharophilie).

III. Der Gebrauch des Begriffs *Halophilie* (Halotoleranz usw.) ist nach dem Gesagten klar. Hier handelt es sich in erster Linie um physiko-chemische Einwirkungen; inwieweit dabei auch osmotische Kräfte eine Rolle spielen, muß jeweils besonders untersucht werden.

Auch die Nomenklatur der jeweiligen Unterabteilungen dieser Gruppen sollte sinngemäß präziser gefaßt werden. So würde ich für die verschiedenen Reaktionsstufen der Mikroorganismen bei physikalischer Trockenheit des Substrates, die in vorliegender Arbeit untersucht wurden, folgende 3 Untergruppen unterscheiden:

- a) Hygrophile Arten: Hemmung der Entwicklung gleich von 99% r. D. an deutlich, Hydraturminimum über 95% r. D. (= Hygrophile Arten von WALTER, 1931).
- b) Xerotolerante Arten: Hemmung erst unterhalb 98% r. D. deutlich, Hydraturminimum unter 95% r. D. (= Mesophile Arten von WALTER, 1931).
- c) Xerophile Arten: Optimum der Entwicklung liegt mitunter deutlich unterhalb 98,5% r. D., Hydraturminimum oft weit unter 90% r. D., deutliche Hemmung erst unterhalb 95% r. D. (Gruppe I = xerophile Arten von WALTER, 1931.)

In gleicher Weise wäre die Nomenklatur in den anderen beiden Gruppen II und III zu gestalten, wie dies für die halophilen Bakterien bereits HOF (1935) durchgeführt hat, der (obligat) halophile, halotolerante und halophobe Formen unterscheidet.

#### D. Zusammenfassung.

Die Lebenstätigkeit von Bakterien und Hefen wird bei verschiedener relativer Dampfspannung (r. D.) an Hand von 19 Bakterienarten (50 Stämme) und 10 Hefen (14 Stämme) und zum Vergleich an 3 Stämmen von *Oospora lactis* untersucht. Als Kriterium der physiologischen Aktivität wurde das Wachstum gewählt.

Für das Verhalten eines Stammes ist sowohl der Grenzwert der Hydratur als auch die Entwicklungsintensität (Verlauf des Wachstums) von Bedeutung. Die absoluten Hydraturminima für das Wachstum lagen für Bakterien bei etwa 90% r. D., für Hefen bei etwa 88% r. D. Diese Werte werden jedoch nur von wenigen Vertretern der beiden Gruppen erreicht. Als besonders wenig widerstandsfähig gegenüber niederer r. D. erwiesen sich die vegetativen Formen mancher Arten von aeroben Sporenbildnern. Ganz allgemein zeigen die Hefen eine etwas größere Resistenz gegen physikalische Trockenheit des Substrates als die Bakterien.

Wie rund 8 Jahre lang durchgeführte Versuche mit gleichen Stämmen zeigten, ist die Konstanz des Verhaltens bei verschiedener r. D. außerordentlich groß. Artkonstanz ist für viele Formen wenigstens größenordnungsmäßig vorhanden. Wo bei den verschiedenen Stämmen einer Art größere Schwankungen auftraten, handelt es sich durchweg um auch in anderer Hinsicht leicht variierende Formen.

Versuche, die geprüften Mikroorganismen an niedere r. D. anzupassen, verliefen innerhalb einer 6monatigen Versuchsdauer ausnahmslos ohne wesentlichen positiven Erfolg.

Paralleluntersuchungen mit Zusatz von äquilibrierter Salzlösung zum Nährsubstrat zeigten, daß die Grenzwerte z. T. höher, z. T. gleich hoch und z. T. niedriger lagen als die in feuchten Kammern bei verschiedener r. D. ermittelten.

Morphologische Beobachtungen ergaben bei Bakterien, vor allem aber auch bei Hefen eine Beeinflussung der Kolonieform und vielfach auch der Gestalt der Individuen durch verschieden hohe r. D. Am Zustandekommen besonderer Wuchsformen sind sowohl der äußere Einfluß (r. D.) als auch innere Faktoren, die je nach der Organismenart verschieden sein können, beteiligt. Bei Hefen sind deutliche Anzeichen für eine Beziehung zwischen der morphologischen Reaktion auf unterschiedliche r. D. und der systematischen Stellung vorhanden.

Bei der Besprechung der Ergebnisse wird auf die Erscheinungen der Xerophilie, Osmophilie und Halophilie bei Mikroorganismen eingegangen.

Herrn Prof. Dr. H. WALTER danke ich herzlich für die vielfache Förderung und Anteilnahme bei der Durchführung dieser Untersuchungen; für die Überlassung von Reinkulturen den Herren Professoren BREDEMANN, RIPPEL-BALDES und STEINER sowie Herrn Oberregierungsrat Dr. STAPP.

### Literatur.

- BLAGOWESCHTSCHENSKY u. Mitarb.: Nachr. d. Mittelasiat. Univ. **14** (1926) (russisch). — BURCIK, E.: Planta (Berl.) **30**, 683 (1940). — Arch. f. Mikrobiol. **14**, 534 (1949). — DOOREN DE JONG, L. E. DEN: Arch. f. Mikrobiol. **4**, 36 (1933). — ERRERA, L.: Bull. Acad. Roy. de Belgique 1899, p. 81. — HEIDE, C. v. d.: Ber. Lehranstalt Geisenheim f. 1911, S. 188. — HEINTZELER, I.: Arch. f. Mikrobiol. **10**, 92 (1939). — HOF, T.: Diss. Amsterdam 1935. — KARAMBOLOFF, N., u. G. KRUMBHOLZ: Arch. f. Mikrobiol. **3**, 113 (1931). — KLÖCKER, A.: Die Gärungsorganismen, Berlin-Wien, 3. Aufl. 1924. — KOHL, F. G.: Die Hefepilze. Leipzig 1908. — KOSTYTSCHEW, S.: Lehrb. d. Pflanzenphysiologie, Berlin (1926). — KROEMER, K., u. G. KRUMBHOLZ: Arch. f. Mikrobiol. **2**, 352 (1931); **3**, 384 (1932). — KRUMBHOLZ, G.: Arch. f. Mikrobiol. **2**, 411, 601 (1931). — LAURENT, E.: Ann. d. l. Soc. belge de microsc. **14**, 31 (1890). — LINDNER, P.: Wschr. f. Brauerei Nr. 6 (1894). — MEISSNER, R.: Techn. Betriebskontr. i. Weinfach, Stuttgart 1920. — MISCHUSTIN, E. N.: Zbl. Bakter. II. Abt. **93**, 371 (1936). — PARR, L. W.: Bact. Rev. Baltimore **3**, 1 (1933). — PLOTHO, O. v.: Arch. f. Mikrobiol. **11**, 33 (1940). — RACIBORSKY, M.: Bull. de l'Acad. d. Sc. Cracovie, Cl. de Sc. math. et natur. 1905, p. 668. — RENNER, O.: Z. Bot. **11**, 305 (1919). — SATAWA, J.: Z. f. Zuckerind. d. Tschech. Rep. **44** (NFi), 93 (1920). — SELIBER, u. KATZNELSON: C. r. d. l. Soc. Biol. **97**, 156, 347, 449, 515 (1927). — SCHOOP, G.: Zbl. Bakter. I. Orig. **134**, 14 (1935). — WALDERDORFF, M.: Bot. Archiv **6**, 84 (1924). — WALTER, H.: Z. Bot. **16**, 353 (1924). — Die Hydratur der Pflanze, Jena 1931. — Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. **64**, 328 (1936).



## Über den Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Farbstoffbildung durch *Penicillium*-Arten<sup>1</sup>.

Von

ANNEMARIE GROSSER, HANNE KUNDTNER-SCHWARZKOPF  
und KONRAD BERNHAUER.

(Eingegangen am 29. November 1949.)

Eines der auffallendsten äußeren Merkmale bei der Kultivierung zahlreicher *Penicillien* ist deren Farbstoffbildung und das dabei zu beobachtende außerordentlich mannigfaltige „Farbenspiel“. Die Farbenpracht von „Pilzgärten“ mikrobiologischer Sammlungen steht der von Blumenärten kaum nach. Die Färbung der meisten *Penicillien* ist so charakteristisch, daß sie auch zur botanisch-mykologischen Beschreibung und Kennzeichnung der einzelnen Arten herangezogen wird [vgl. THOM (1930), NIETHAMMER (1949)].

Diese auffallende Farbstoffbildung hat in zahlreichen Fällen zur Namengebung von *Penicillium*-Arten Anlaß gegeben (z. B. *P. coeruleum*, *P. roseo-purpureum*, *P. carmino-violaceum*, *P. aurantio-brunneum*, *P. cyaneum*, *P. rubrum*, *P. glaucum*, *P. luteum*, *P. sanguineum*, *P. purpurogenum* u. v. a.). Aber auch ganze Untergruppen oder Sektionen des *Penicillium*-Systems wurden nach dem Farbstoffbildungsvermögen ihrer Vertreter benannt (z. B. die Sektionen *Aeruginosa*, *Viridicata*, *Glaucæ*; die Untergruppe *Luteo-virida* mit der Sektion *Luteo-purpurogena*). Das Farbstoffbildungsvermögen ist aber nicht auf diese Sektionen beschränkt, sondern in der ganzen Pilzgruppe weit verbreitet. Während sich manche Arten — wie häufig schon aus der Namengebung ersichtlich ist — durch ihre leuchtend gelben, roten, grünen, blauen oder violetten Farben der verschiedensten Tönung auszeichnen, gibt es natürlich auch solche, die kaum oder nur schwach gefärbt bzw. mißfarben sind.

Im Gegensatz zu dieser außerordentlich mannigfaltigen Farbstoffbildung der *Penicillien* steht, daß über die chemische Zusammensetzung der Farbstoffe erst sehr wenig und über ihre Funktion im Zellgeschehen noch fast nichts bekannt ist. Wir hatten geplant, uns mit der Farbstoffbildung durch *Penicillien* von mykologisch-botanischen, biologischen und biochemischen Gesichtspunkten aus eingehender zu beschäftigen, doch mußte diese Arbeit aus äußeren Gründen Anfang 1945 im Anfangsstadium abgebrochen werden. Es konnte jedoch bereits in den diesbezüglichen Voruntersuchungen eine Reihe nicht uninteressanter Befunde über die Beeinflussbarkeit der Farbstoffbildung der *Penicillien* durch äußere Faktoren gemacht werden, worüber hier berichtet sei.

<sup>1</sup> Aus dem vormaligen Institut für Biochemie u. Nahrungsmittelchemie der Deutschen Technischen Hochschule in Prag. — Vgl. auch Diplom-Arbeit H. KUNDTNER, Prag, März 1945.

Über die Beeinflussbarkeit der Farbstoffbildung der Pilze durch die Zusammensetzung des Nährmediums liegen bisher erst relativ wenige Untersuchungen vor (vgl. dazu FOSTER, 1949). Im gegebenen Zusammenhang interessieren die über die Beeinflussung der Farbstoffbildung durch *Penicillien* gemachten Beobachtungen. Dabei muß vor allem auf eine Arbeit von METZ (1930) verwiesen werden, der in einer ausgedehnten Studie die Beeinflussbarkeit der Farbstoffbildung von Pilzen durch Spurenelemente (Fe, Zn und Cu) aufgezeigt hat. Untersucht wurde außer anderen Pilzen *P. sulfureum*, *P. luteum* und eine nicht näher bestimmte *Penicillium*-Art unter Benützung der Oberflächenkultur. Dabei hatte vor allem eine Kombination der drei Spurenelemente einen starken Einfluß auf die Intensität der Farbstoffbildung. Gegenüber den einzelnen Elementen verhielten sich die Pilze individuell etwas verschieden.

Tabelle 1.

Farbstoffbildung der verwendeten *Penicillium*-Arten beim Wachstum auf Bierwürze-Agar.

Nr.	Pilzart	Färbung	
		der Oberseite	des Agars
P 6	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	grün-gelb	orange-rot bis braun
P 10	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	gelb-rosa-violett-grün	rotbraun bis braun
P 23	<i>P. spec. (Bivert. symm., Ascogena)</i>	grau-grün-rosa-beige	rot bis braun
P 29	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	schmutzig-grün	rot bis braun
P 32	<i>P. aureo-limum ZAL.</i>	schmutzig-graugrün	violett
P 41	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	weiß-grün	beige bis braun
P 54	<i>P. spec. (Bivert. symm., Luteo-purpurogena)</i>	hell- bis dunkelgrün	rotbraun bis braun
P 69	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	braun-weiß, rosarot gefleckt	hellbraun bis rötlich
P 78	<i>P. griseo-brunneum SOPP</i>	schmutzig-grün	braun
P 86	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	schmutzig-grün	braun
P 91	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	beige	hellbraun
P 107	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	schmutzig-grün	hellbraun
P 124	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	schmutzig-grün	rot bis braun
P 130	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	schmutzig-grün	braun bis violett
P 156	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	grün, weißgefleckt	beige
P 169	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	gelb	rotbraun bis rot
P 176	<i>P. baculatum WESTL.</i>	schmutzig-grün, orange-gefleckt	rotbraun bis braun
P 211	<i>P. notatum WESTL.</i>	schmutzig-grün	braun
P 214	<i>P. luteum ZUKAL</i>	weiß	dunkelbraun
P 219	<i>P. purpurogenum STOLL</i>	weiß	purpurrot
P 226	<i>P. baculatum WESTL.</i>	grün	braun
P 228	<i>P. citreo-roseum DIERCK</i>	schmutzig-grün	beige bis braun
P 334	<i>P. spec. (Bivert. symm.)</i>	schmutzig-grün, rosa-gefleckt	tief rotbraun
P 412	<i>P. sanguineum SOPP</i>	hellgrün, gefleckt	rot bis braun
P 427	<i>P. rubrum GRASSB. STOLL</i>	grau-grün	dunkelrot

Tabelle 2.

Beispiele für die Beeinflussung der Farbstoffbildung durch die Art des Nährmediums und die Züchtungsmethode.

Nr.	Meth.	Nähr- medium	Zusätze	End-pH	Farbstoff	
					im Medium	im Mycel <sup>1</sup>
P 176	O. K.	A	O, Asp.	6,0	dunkel-orangerot	grün/tief-orangerot
		B	Mz.	6,0	hell	hell
		B	Rz.	6,0	dunkel-orangerot	grün/orangerot
		C	O	6,0	orangerot	grün/hellrot
	S. K.	A	O, Asp.	6,3	orange	tief orangerot
		A	Glut.	6,3	dunkel-braun	tief dunkelbraun
		A	Zn.	6,3	orange	orange
		B	Mz.	6,0	hellgelb	hell
		B	Rz.	6,0	orange	orange
		C	O	6,2	hellorange	orange
	O. K.	A	O	5,0	dunkelrot	weißbrosa/dunkelrot
		A	Asp., Zn	5,0	intensiv dunkelrot	weißbrosa/dunkelrot
		B	Mz.	4,5	farblos	farblos
		C	O	4,0	orange	farblos
P 219	O. K.	A	O	4,5	tief dunkelrot	dunkelrot
		A	Asp.,			
	S. K.		Glut.	4,5	intensiv dunkelrot	dunkelrot
		A	Mg	4,5	hellrot	intensiv dunkelrot
		A	Zn.	4,5	farblos	hellrot
		B	Mz.	4,0	farblos	farblos
		B	Rz.	4,0	weinrot	weinrot
		C	O	4,5	rotbraun	rotbraun
		D	O	4,5	tiefrot	tiefrot
	O. K.	A	O, Asp.	5,8	tief dunkel- orangerot	graugrün/orange- gelb
		B, C	O	5,6	farblos	hellgelb
P 334	S. K.	A	O, Asp., Zn.	5,8	dunkel-orange	orange-braun
		A	Glut.	5,8	gelb	gelb-braun
		B	Mz., Rz.	5,4	farblos	gelblich
		C	O	5,6	orange-braun	orange-braun

Abkürzungen: Nährmedien vgl. im Text. Zusätze: Asp. = 0,1% Asparagin. Glut. = 0,1% Glutaminsäure, Mz. = 2% Milchzucker, Rz. = 2% Rohrzucker, Zn = 0,1% Zinksulfat, Mg = 0,2% Magnesiumsulfat. — O.K. = Oberflächenkultur, S.K. = Submers-Kultur.

<sup>1</sup> In der Oberflächenkultur ist häufig die Myceloberseite anders gefärbt als die Unterseite. Dies ist durch die Bezeichnung angedeutet; so bedeutet z. B. weiß/gelb: Oberseite weiß, Unterseite gelb.

## A. Methodik.

*Pilzstämme.* Die verwendeten Pilzkulturen wurden in der mikrobiologischen Abteilung unseres ehemaligen Institutes aus natürlichen Substraten gewonnen, reingezüchtet und wenigstens zum Teil identifiziert<sup>1</sup>. Dabei wurden solche Kulturen ausgewählt, die sich durch intensive Farbstoffbildung auf Schrägagar auszeichneten. Die Weiterführung der Stammkulturen erfolgte durch Überimpfung auf Bierwürze-Agar in 14tägigen Intervallen. Es wurden 25 Pilzstämme untersucht, deren Farbenspiel auf Bierwürze-Agar in der Tab. 1 angeführt ist. Diese Angaben werden deshalb gemacht, um zu zeigen, daß auf diesem Substrat häufig andere Farbstoffe gebildet werden, als auf den unten angeführten flüssigen Nährmedien. In der weiteren Darstellung werden die Pilzstämme nur unten den Nummern der Tabelle 1 aufgeführt.

Zur Prüfung der Farbstoffbildung wurden die *Penicillien* stets sowohl in Oberflächenkultur als auch in Submerskultur (Schüttelkultur)<sup>2</sup> gezüchtet. Temp. 26°C, Versuchsdauer bei den Ruheversuchen in der Regel 20 Tage, bei den Schüttelversuchen 14 Tage. Dabei wurden folgende Nährlösungen benützt:

A) CZAPEK-DOX-Medium: 3 g  $\text{NaNO}_3$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g KCl, 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 g techn. Glucose, 100 cm<sup>3</sup> Hefeautolysat (1 : 10) auf 1 l Leitungswasser.

B) HINDSche Nährlösung: 1 g  $\text{KNO}_3$ , 0,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , entweder mit 20 g Milchzucker oder 20 g Rohrzucker auf 1 l Leitungswasser.

C) RAULIN-Nährlösung: 70 g techn. Glucose, 4 g Weinsäure, 4 g Ammoniumtartrat, 0,6 g Ammoniumphosphat, 0,6 g Kaliumcarbonat, 0,4 g Magnesiumcarbonat, 0,24 g Ammoniumsulfat, 0,07 g Zinksulfat, 0,07 g Kaliumsilikat auf 1,5 l Leitungswasser ( $\text{MgCO}_3$  und Weinsäure zusammen gelöst und zur Lösung der übrigen Bestandteile zugesetzt).

D) Maiswürze: Hergestellt durch Einwirkung von Malzextrakt auf Maismehl<sup>3</sup>.

Um die Beeinflussung der Farbstoffbildung durch die Art des Nährmediums und die Züchtungsmethodik aufzuzeigen, sind in Tab. 2 drei Beispiele angeführt. Das Ergebnis der sonstigen Prüfungen wird unten zusammenfassend wiedergegeben.

Zur Isolierung der Farbstoffe aus dem Trockenmycel und dem Nährmedium wurden Extraktionsversuche mit einer großen Anzahl verschiedener organischer Lösungsmittel durchgeführt. Die zur Extraktion der Farbstoffe jeweils geeigneten Lösungsmittel und die Färbungen in diesen sind in der Übersicht auf S. 240 vermerkt. In fast allen angeführten Fällen wurde zur Züchtung der Pilze das Nährmedium A verwendet. Zumeist erfolgte die Züchtung in der Submerskultur (S.K.), nur in einigen Fällen in der Oberflächenkultur (O.K.). Zur Extraktion diente entweder das Mycel (M) oder das Kulturfiltrat (K.F.) oder beides. In vielen Fällen mußte das Filtrat angesäuert werden (HCl), bevor der betreffende Farbstoff in das Lösungsmittel ging.

Die Gewinnung der Farbstoffe in größeren Mengen wurde unter Benützung der Rühr-Belüftungs-Methodik<sup>4</sup> vor allem bei *P. purpurogenum* (P 219) vorgenommen. Dazu dienten 20 l Reaktionsgefäße mit 10 l Nährmedium A, die mit je 200 cm<sup>3</sup> Vorkultur (4tägige Schüttelkultur im gleichen Medium) beimpft wurden. Rührgeschwindigkeit: 160 Umdr./min. Temp. 26°. Versuchsdauer 6 Tage.

<sup>1</sup> Frau Prof. Dr.-Ing. A. NIETHAMMER und ihren Mitarbeitern sei auch hier für diese Arbeit verbindlichst gedankt.

<sup>2</sup> Zur Methodik der Schüttelkultur in der von uns gehandhabten Form vgl. K. BERNHAUER u. J. RAUCH (1948, a, 1950) sowie K. WEIGNER u. O. WEIGNER (1950).

<sup>3</sup> Vgl. dazu\* die Arbeitsvorschrift zur Herstellung von Maiswürze-Agar bei K. BERNHAUER (1939). Natürlich entfällt im obigen Fall der Agarzusatz.

<sup>4</sup> Zur Methodik vgl. K. BERNHAUER u. J. RAUCH (1948, b, 1950) sowie K. WEIGNER u. O. WEIGNER (1950).



Isolierung des Farbstoffs aus dem Kulturfiltrat nach dem Ansäuern mit HCl durch Ausschütteln mit Essigester oder durch Adsorption an Carboraffin, Verreiben desselben mit geglühtem Natriumsulfat und Elution mit Isobutylalkohol. Eine wesentlich bessere Ausbeute wurde bei Durchführung des Versuches unter Zusatz von 0,2%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  zum Medium A erhalten, wobei der Farbstoff ganz überwiegend im Mycel verblieb. Extraktion des Mycels mit Isobutylalkohol, Trocknen des Extraktes über Blaugel, Vakuumverdampfung. Bei der Verarbeitung von 10 l Medium wurden 50–60 g Trockenmycel und aus diesen 34 g eines intensiv purpurroten, amorphen Rohproduktes (das allerdings noch viel Ballaststoffe enthielt) gewonnen.

P 6	(S.K., A)	M. u. K.F. (HCl)	Äther oder Essigester	grün
P 69	(O.K., A)	K.F. (HCl)	Essigester	orangebraun
P 86	(O.K., A)	K.F.	Essigester	orangerot
P 169	(S.K., A)	M. u. K.F.	Äther	dunkelgelb
P 176	(S.K. u. OK., A)	M. u. K. F. (HCl)	Äther + Methanol (100 : 5)	orangerot
P 219	(S.K., A)	K.F. (HCl)	Essigester	purpurrot
P 334	(S.K., A)	K.F. (HCl)	Essigester + Methanol (100 : 5)	orange
P 427	(S.K., A u. O.K., D)	K.F.	Äther oder Isobutylalk.	dunkelrot

### B. Ergebnisse.

Aus der großen Zahl der mit 25 *Penicillium*-Stämmen durchgeführten Versuche über die Beeinflussung der Farbstoffbildung durch die Versuchsbedingungen werden nachfolgend einige Beispiele wiedergegeben, bei denen durch Änderung der Zusammensetzung des Nährmediums sowie der Züchtungsmethodik ein besonders deutlicher Effekt erzielt werden konnte (Fälle, in denen die verschiedenen Zusätze usw. keine Änderung verursachten, sind hier nicht angeführt).

1. *Beeinflussung der Farbstoffbildung durch die Zusammensetzung des Nährmediums.* Die Nährlösung A (CZAPEK-DOX-Salze mit Glucose und Hefeautolysat) ergab bei den untersuchten Penicillien in der Regel eine bessere Farbstoffbildung als die RAULINSche Nährlösung (C). In der HINDSchen Nährlösung (B) wurde bei Verwendung von Milchzucker keine oder nur geringe Farbstoffbildung (bei recht mäßigem Wachstum), mit Rohrzucker meist auch nur schwache (bei gutem Wachstum) erzielt (vgl. dazu Tab. 2).

Unter Verwendung der Nährlösung A, die sich für die Farbstoffbildung zumeist als gut geeignet erwies, wurde der Einfluß verschiedener Zusätze (wie 0,1% Asparagin, Glutaminsäure und Zinksulfat) auf die Farbstoffbildung eingehender untersucht. In manchen Fällen bewirkten diese geringfügigen Änderungen des Nährmediums einen auffallenden Unterschied in der Farbstoffbildung. Dies gilt besonders für die Submerskultur.

Es sei hier betont, daß unsere Versuche nur orientierenden Charakter haben. Den die Farbstoffbildung beeinflussenden Faktoren wurde im einzelnen nicht näher nachgegangen. Es wurde auch nicht ein genau definiertes synthetisches Nährmedium angewendet, sondern es wurde technische Glucose benützt und Hefeautolysat zugesetzt. Alle erforderlichen Nährsalze und Wachstumsfaktoren (Wachstumsstoffe und Spurenelemente) waren daher in reichlichem Maße vorhanden. Es wurden auch keinerlei Maßnahmen zur Entfernung von Spurenelementen getroffen. Es ist daher besonders bemerkenswert, daß bereits bei Verwendung eines im Hinblick auf die Zusammensetzung derart kompletten Nährmediums durch die erwähnten Zusätze in manchen Fällen sehr bemerkenswerte Beeinflussungen der Farbstoffbildung zu beobachten waren. Bei den Versuchen mit Zink wurde dieses in großem Überschuß angewendet, also in einer Menge, die weit über dem Optimum lag. Unsere diesbezüglichen Ergebnisse sind daher mit denen von METZ (1930), der ein von Spurenelementen befreites Nährmedium benutzte, Zink (sowie andere Elemente) in optimaler Menge zusetzte, und in der Oberflächenkultur arbeitete, nicht vergleichbar.

*Asparagin* hatte in der Oberflächenkultur nur in 2 Fällen eine Wirkung (bei P 124 Verstärkung der Braunfärbung und bei P 219 der Dunkelrotfärbung der Flüssigkeit), in 21 anderen Fällen war es ohne Einfluß auf die Farbstoffbildung. In der Submerskultur verursachte *Asparagin* bei der Prüfung von 23 Pilzen in einer Anzahl von Fällen eine Verstärkung der Farbstoffbildung (erste 4 Nummern der Tab. 3), in anderen schwächte es diese (P 29 und P 156 in Tab. 3).

Tabelle 3. *Einfluß von Asparagin auf die Farbstoffbildung.*

Nr.	Asparagin	Färbung	
		der Kulturflüssigkeit (mit $p_H$ -Wert)	des Mycels
P 10	{ ohne: mit:	gelblich (5,5) dunkelgelb (5,5)	tief-orangelgelb hellbraun
P 32	{ ohne: mit:	bräunlich (6,0) dunkelrotbraun (6,0)	rotbraun dunkelrot
P 124	{ ohne: mit:	dunkelbraun (6,5) tief dunkelbraun (6,5)	hellbraun hellbraun
P 156	{ ohne: mit:	hellbraun (6,5) rotbraun (6,5)	hellbraun rotbraun
P 29	{ ohne: mit:	blau bis grau-grün (6,5) farblos (6,5)	beige schmutzigweiß
P 211	{ ohne: mit:	orange (5,6) gelblich (5,6)	orange-gelb gelblich

*Glutaminsäure* wurde im Nährmedium A in der Submerskultur in 23 Fällen geprüft. In 2 Fällen (P 214 und P 226) verstärkte sie beträchtlich die Gelbfärbung; in anderen Fällen wirkte sie abschwächend (Tab. 4.)

Tabelle 4. *Einfluß von Glutaminsäure auf die Farbstoffbildung.*

Nr.	Glutamin- säure	Färbung	
		der Kulturflüssigkeit (mit pH-Wert)	des Mycels
P 10	{ ohne: mit:	gelblich (5,5) farblos (5,5)	tief orange gelb farblos
P 29	{ ohne: mit:	blau bis graugrün (6,5) farblos (6,5)	beige schmutzigweiß
P 124	{ ohne: mit:	dunkelbraun (6,5) gelb (6,0)	hellbraun gelb
P 211	{ ohne: mit:	orange (5,6) gelblich (5,6)	orange gelb gelblich
P 334	{ ohne: mit:	intensiv orange (5,8) gelb (5,8)	orangebraun braungelb

Zink verstärkte im Nährmedium A in der Oberflächenkultur bei P 219 die Bildung des roten Farbstoffes, bei P 427 dagegen verursachte es eine völlige Änderung in der Farbstoffbildung, und zwar in der Kulturflüssigkeit von dunkelrot in gelb und im Mycel von gelbbraun in weißgelb. In der Schüttelkultur (Nährmedium A, 11 Pilze) wirkte Zink bei dem gleichen Pilz (P 427) farbvertiefend (von hellgelb nach tiefgelb), bei P 219 verhinderte es die Farbstoffbildung fast völlig (Kulturflüssigkeit ohne Zink tief dunkelrot, mit Zink farblos; Mycel dunkelrot bzw. hellrot). In anderen Fällen verminderte es die Farbstoffbildung (gelbe und braune Färbungen bei P 124, P 156 und P 214).

2. *Beeinflussung der Farbstoffbildung durch die Züchtungsmethode.* Bei Anwendung des gleichen Nährmediums (A, ohne Zusätze) war die Farbstoffbildung in der Oberflächenkultur in einigen Fällen beträchtlich stärker als in der Submerskultur. Bei manchen Pilzen blieb das Nährmedium in der Submerskultur sogar völlig farblos (P 41, 78, 226 in Tab. 5), bei anderen bedingte die Submerskultur dagegen eine Farbvertiefung (P 211, 228). Bei wieder anderen Pilzen prägte sich der Unterschied zwischen Oberflächen- und Submerskultur vor allem im Farbstoffgehalt des Mycels aus, wobei häufig das Submersmycel intensiver gefärbt war, als das Oberflächenmycel, während das Nährmedium sich umgekehrt verhielt (P 10, 107, 214, 176, 412). Bei P 6, 29, 86 und 427 besaß das Nährmedium in der Submerskultur eine ganz andere Farbe als in der Oberflächenkultur (Tab. 5).

3. *Beobachtungen über den Ort der Farbstoffanhäufung.* Die Farbstoffbildung findet zweifellos in der Zelle selbst statt. Bei mikroskopischer Untersuchung des Pilzmycels kann man manchmal beobachten, daß die Zellen von dichten Farbstoffmassen erfüllt sind (z. B. P 176 in

Tabelle 5.

*Einfluß von Oberflächen- (O.K.) und Submerskultur (S.K.) auf die Farbstoffbildung.*

Nr.	Kultivierungs- methode	Färbung	
		der Kulturflüssigkeit (mit pH-Wert)	des Mycels
P 41	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	grüngelb (6,5) farblos (6,8)	dunkelgrün dunkelgrün
P 78	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	rotviolett (5,5) farblos (5,5)	hellgrün/violett hellbraun
P 226	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	orangerot (5,5) farblos (6,0)	grün/weiß gelblich
P 211	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	gelb (5,6) orange (5,6)	weiß orange gelb
P 228	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	dunkelgelb (6,0) braungelb (6,5)	grün/gelblich gelbbraun
P 10	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	orangerot (5,5) gelblich (5,5)	weiß/gelb tief orangerot
P 107	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	gelb (6,5) grünlich (6,0)	weißgrau dunkelgrün
P 214	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	gelb (5,8) gelb (6,0)	weiß intensiv gelb
P 176	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	dunkel orangerot (6,0) orange (6,3)	grün/orangerot tief orangerot
P 412	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	tief dunkelrot rosa	dunkelgrün/dunkelrot dunkelrot
P 6	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	orangerot (6,0) dunkelgrün (6,0)	dunkelgrün dunkelgrün
P 29	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	braun (6,5) blau bis graugrün (6,5)	weiß/gelbrot beige
P 86	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	tief orangerot (5,5) hellgrün (5,5)	grün/rotbraun hellgrün
P 427	$\begin{cases} \text{O.K.} \\ \text{S.K.} \end{cases}$	dunkelrot (6,0) hellgelb (6,0)	gelbbraun grüngelb

Medium A, S. K.). — Im Hinblick auf den Ort der Farbstoffanhäufung selbst lassen sich folgende Fälle unterscheiden:

Häufig wird eine erhebliche Farbstoffmenge an das Medium abgegeben. Es sind daher in vielen Fällen Mycel und Medium annähernd



gleich intensiv gefärbt (vgl. in Tab. 2, ferner in Tab. 3 die Pilze P 156, 211, oder in Tab. 5 die Pilze P 176, 412 usw.).

In einigen Fällen wird der Farbstoff überhaupt nicht in der Zelle gespeichert, sondern völlig in das Medium ausgeschieden. So war manchmal bei einem weißen Oberflächenmycel (wenn man von Conidien absieht) das Medium gelb bis orangerot gefärbt (vgl. in Tab. 5 die Pilze 107, 211, 214, 226). In anderen Fällen war das Mycel nur schwach gefärbt, das Medium sehr intensiv (z. B. in Tab. 5 P 228); auch für die Submerskultur trifft dies manchmal zu (vgl. in Tab. 5 z. B. P 29).

Bei manchen Pilzen kann man aber auch ein umgekehrtes Verhalten feststellen, indem der Hauptanteil der Farbstoffe in der Zelle verbleibt. Dies trifft häufig für die submerse Pilzzüchtung zu. So wird manchmal in der Submerskultur sogar der gesamte Farbstoff im Mycel gespeichert (vgl. in Tab. 5 die Pilze P 41, 78 und 226), in anderen Fällen der überwiegende Anteil (vgl. in Tab. 5 P 10, 107, 214, 176, 412). — In einem Fall gelang es durch Erhöhung des Mg-Gehaltes im Medium A (von 0,05 auf 0,25% Magnesiumsulfat) die Abgabe des Farbstoffes an die Flüssigkeit stark einzuschränken, so daß die Hauptmenge im Submersmycel verblieb (vgl. Tab. 2, P 219). Dies erwies sich auch methodisch von Bedeutung, da die Gewinnung des Farbstoffes aus dem Mycel leichter gelang als aus dem Nährmedium (vgl. oben).

4. Versuche zur *Isolierung der Farbstoffe* wurden nur in einigen Fällen vorgenommen, bei denen die Farbstoffbildung besonders auffallend war. Immerhin konnte auf diese Weise eine Grundlage für die quantitative Ermittlung des Farbstoffgehaltes (durch colorimetrische Messung der Farbintensität) geschaffen werden. Zugleich wurde die präparative Isolierung einiger Farbstoffe angebahnt und so eine gewisse Vorarbeit für weitere Untersuchungen in dieser Richtung geleistet (vgl. oben). Ferner wurde in einigen Fällen gezeigt, daß es mit Hilfe der Rühr-Belüftungskultur möglich ist, weitaus rascher größere Farbstoffmengen zu gewinnen als mittels der Oberflächenkultur.

### C. Diskussion.

Der Pilzstoffwechsel läßt sich bekanntlich häufig bereits durch geringfügige Änderungen der äußeren Bedingungen, besonders der Zusammensetzung des Nährmediums, beträchtlich beeinflussen (vgl. dazu FOSTER, 1949). In erhöhtem Maße gilt dies für die Submerskultur, in der die Pilze auf verschiedene derartige Einflüsse viel deutlicher reagieren als in der Oberflächenkultur (so z. B. bei der Citronensäurebildung, Fumarsäurebildung usw.). Wie die vorliegende Untersuchung zeigt, kann diese Beobachtung auch beim Studium der Farbstoffbildung durch *Penicillien* gemacht werden. Dabei bietet sich gerade hierbei die Möglichkeit, den Einfluß verschiedener Faktoren an einem auffallenden, äußerlich sicht-

baren Merkmal verfolgen zu können. Einige besonders bemerkenswerte derartige Beobachtungen seien hier noch hervorgehoben.

So bewirkte ein Zusatz von Asparagin zu einem modifizierten CZAPEK-Dox-Medium in der Submerskultur bei einigen Pilzen eine starke Farbvertiefung, bei anderen eine Verminderung der Farbstoffbildung. Ein Glutaminsäurezusatz schwächte in mehreren Fällen die Farbstoffbildung ab. Zink (in überoptimaler Menge angewendet) verursachte in einem Fall eine völlige Änderung der Farbstoffbildung, bei manchen Pilzen wirkte es farbvertiefend, bei anderen farbvermindernd. Besonders große Unterschiede bewirkte die Art der Pilzkultivierung; so blieb in manchen Fällen in der Submerskultur das Nährmedium völlig farblos, bei anderen Pilzen besaß es eine ganz andere Farbe als in der Oberflächenkultur, manchmal konnte in der Submerskultur eine Farbvertiefung festgestellt werden. Häufig war das Submersmycel intensiver gefärbt als das Oberflächenmycel, während das Nährmedium sich umgekehrt verhielt. In manchen Fällen gelang es auch durch Wahl der Versuchsbedingungen einen Einfluß darauf zu nehmen, ob die Farbstoffe während der Pilzzüchtung in der Zelle verbleiben oder an das Medium abgegeben werden.

Angesichts des individuell so verschiedenartigen Verhaltens der Pilze ist es natürlich nicht möglich, eine *Erklärung für die Beeinflussung der Farbstoffbildung durch die verschiedenen Faktoren* zu geben. Dabei ist zunächst zu beachten, ob sich die verschiedenen einflußnehmenden Faktoren nur in quantitativer Hinsicht auswirken (Steigerung oder Verminderung der Farbstoffbildung) oder auch im Hinblick auf die Art der Farbstoffe selbst. In diesem Zusammenhang muß berücksichtigt werden, daß durch manche Pilze zweifellos zwei oder mehrere Farbstoffe gebildet werden, so daß je nach Wahl der Bedingungen jeweils der eine oder andere überwiegt. Ferner muß bedacht werden, daß der gleiche Farbstoff, abhängig vom  $p_H$ , Farbänderungen zeigen kann. Es wurden daher stets  $p_H$ -Messungen im Nährmedium durchgeführt. In keinem Fall konnte aber eine eindeutige Beziehung zwischen einer Farbänderung und dem  $p_H$ -Wert festgestellt werden. — Jedenfalls kann zur Zeit keine Erklärung für das Wesen der Beeinflussung der Farbstoffbildung durch verschiedene Faktoren gegeben werden.

Es erscheint durchaus möglich, daß manchen Farbstoffen die Funktion von Redox-Körpern zukommen mag und daß sie daher im hydrierten oder dehydrierten Zustand eine andere Farbe haben können. Da aber alle Pilzzüchtungen unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurden und auch zwischen der Oberflächenkultur und der Submerskultur kein grundsätzlicher Unterschied in der Sauerstoffspannung besteht, kann von einer Beeinflussung der Färbung durch den  $r_H$ -Wert abgesehen werden.

Über die Funktion der *Penicillium*-Farbstoffe im Zellgeschehen kann bisher gleichfalls noch nichts ausgesagt werden. Manche derselben mögen als Redox-Systeme fungieren. So wird z. B. das Lactoflavin von manchen Pilzen (*Eremothecium Ashbii*, *Asp. flavus* u. a.) in weitaus größeren Mengen gebildet, als dem Pilz-

bedarf entspricht. Auch manche *Fusarium*farbstoffe scheinen zu Dehydrierungsprozessen in Beziehung zu stehen. — Von Interesse ist ferner, daß manche Pilzfarbstoffe antibiotische Eigenschaften besitzen, wie das durch *P. citrinum* gebildete Citrinin.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bedürfen noch einer *Diskussion von botanisch-mykologischen Gesichtspunkten* aus. Wie bereits einleitungsweise erwähnt, wird das für *Penicillien* charakteristische Farbenspiel zur botanischen Beschreibung und Kennzeichnung der Arten herangezogen. Es wurde auch die Forderung erhoben, dieses Farbenspiel nur bei Benützung bestimmter Nährböden als Klassifizierungsmerkmal für die Kennzeichnung und Bewertung der verschiedenen Arten heranzuziehen [NIETHAMMER (1949)]. Wie berechtigt diese Forderung erscheint, ist aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung ersichtlich, denn nicht nur bei flüssigen Nährmedien, sondern auch bei den für die Kennzeichnung der Arten üblicherweise benützten Agarnährböden werden bestimmt mancherlei Unterschiede in der Farbstoffbildung auftreten und manchmal werden sich vielleicht völlig andere Färbungen ergeben. Die obige Forderung muß aber vor allem dahin erweitert werden, daß bei Angaben über das Farbenspiel der *Penicillien* stets angeführt werden muß, auf welchen Nährböden dieses zustande kommt. Vor allem ist dies dann notwendig, wenn das Farbenspiel als charakteristisches Merkmal für die Beschreibung der Arten verwendet werden soll.

### *Zusammenfassung.*

Es wird gezeigt, daß sich die Farbstoffbildung der *Penicillium*-arten in recht erheblichem Ausmaß durch die Züchtungsbedingungen beeinflussen läßt. Bereits bei der vergleichenden Kultivierung der Pilze in der Oberflächen- und Submerskultur können auffallende Unterschiede beobachtet werden. Ferner konnte durch den Zusatz von Asparagin, Glutaminsäure und Zinksulfat besonders in der Submerskultur die Farbstoffbildung recht erheblich geändert werden. Dabei verhielten sich allerdings die einzelnen Pilze individuell außerordentlich verschieden, so daß keine allgemein gültigen Gesetzmäßigkeiten über die Beeinflußbarkeit des Prozesses abgeleitet werden können. Wohl aber können bestimmte Typen von Fällen aufgestellt werden, denen jeweils eine Reihe von *Penicillien* zuzuordnen ist.

### **Literatur.**

BERNHAEUER, K.: Gärungschemisches Praktikum, 2. Aufl., S. 39. Berlin 1939. — BERNHAUER, K., u. J. RAUCH: (a) Biochem. Z. **319**, 77 (1948); (b) **319**, 102, (1948); **320**, 368 (1950). — FOSTER, J. W.: Chemical Activities of Fungi, New York: Academic Press, Inc., 1949. — METZ, O.: Arch. Mikrobiol. **1**, 196 (1930). — NIETHAMMER, A.: Die Gattung *Penicillium* LINK. Stuttgart 1949. — THOM, CH.: The *Penicillia*. London 1930. — WEIGNER, K., u. O. WEIGNER: Chem. Ing. Techn. **22**, 129 (1950).

Prof. Dr. KONRAD BERNHAUER, Stockstadt/Main, Obernburger Str. 5.



## Einige Beobachtungen über die Conidienbildung in der Submerskultur verschiedener *Penicillium*-Arten<sup>1</sup>.

Von

ANNEMARIE GROSSER, HANNE KUNDTNER-SCHWARZKOPF  
und KONRAD BERNHAUER.

(Eingegangen am 29. November 1949.)

Nach der üblichen Anschauung findet bei der submersen Züchtung von *Penicillien* nur eine Entwicklung von rein vegetativen Hyphen statt, während die Ausbildung von Conidien unterbleibt. Im Laufe der letzten Jahre sind aber einige Beobachtungen bekannt geworden, denen zufolge unter bestimmten Versuchsbedingungen auch in der Submerskultur Conidien gebildet werden.

So konnten wir bei der Durchführung der Gluconsäurebildung in der Schüttelkultur bereits vor vielen Jahren beobachten, daß dabei manchmal vereinzelte Conidien von *Asp. niger* entstehen (selbstverständlich wurde dabei sporulieren-des Randmycel streng vermieden). Gelegentlich einer im Jahre 1944 durchgeführten Untersuchung über die Farbstoffbildung durch *Penicillium*-arten (vgl. voranstehende Mitteilung) konnten wir feststellen, daß die überwiegende Anzahl der von uns untersuchten Pilzstämme auch in der Submerskultur Conidien bildet. Inzwischen sind auch von anderer Seite einige Beobachtungen über dieses Phänomen mitgeteilt worden. So fanden FOSTER u. Mitarb. (1945), daß die Conidienbildung beim submersen Wachstum von *P. notatum* in flüssigen Nährmedien durch eine hohe Ca-Ionen-Konzentration begünstigt wird (0,5—5,0%  $\text{CaCl}_2$ , entsprechend 0,18 bis 1,8% Ca). GILBERT u. HICKEY (1946) fanden bei *Pen. notatum* submerse Conidienbildung aber auch in den verschiedensten Nährmedien mit normalem Ca-Gehalt, wenn dieselben 0,05—0,1% Eisen enthielten. Im allgemeinen beobachteten sie nur spärliche Conidienbildung, wenn die vegetative Entwicklung durch kräftiges Schütteln und damit gute Belüftung gefördert wurde, wogegen in Kulturen mit schwachem oder mäßigem Wachstum starke Sporulierung stattfand. Diese Beziehung zwischen dem Ausmaß des Wachstums und der Sporulierung stimmt mit den Beobachtungen von FOSTER u. Mitarb. (1945) grundsätzlich überein.

Unsere eigenen Beobachtungen über die submerse Conidienbildung stützen sich auf die Untersuchung von 24 *Penicillium*-Stämmen. Die Durchführung der Submersversuche erfolgte in der Schüttelkultur in üblicher Weise in verschiedenen Nährmedien.

Als Grundmedium (A) diente CZAPEK-DOX-Nährlösung mit 4% techn. Glucose und 10% Hefeautolysat (1 : 10, in üblicher Weise hergestellt). Zu diesem Medium wurden jeweils Zusätze von 0,1% Asparagin (in Tab. 1 als a bezeichnet), 0,1% Glutaminsäure (b), 0,1% Glycin (c), 0,1% Harnstoff (d), 0,1% Zinksulfat (Zn) oder 0,1% Mangansulfat (Mn) gemacht. Ferner wurde die HIND-Nährlösung

<sup>1</sup> Aus dem ehemaligen Institut für Biochemie und Nahrungsmittelchemie der Deutschen Techn. Hochschule in Prag. — Vgl. auch Diplomarbeit H. KUNDTNER, Prag, März 1945.



Tabelle 1.

*Conidien- und Mycelbildung in der Submerskultur unter dem Einfluß verschiedener Zusätze zum Nährmedium.*

Zeichenerklärung: Bezeichnungen für Nährmedien und Zusätze vgl. im Text.  
+++ sehr viel; ++ viel (durchschnittlich normal); – wenig; (+) sehr wenig; 0 fehlend.

Pilz-Stamm	Nähr- medium	Zusätze	Conidien- menge	Mycel	
				Menge	Form
P 6	A	0, a	++	++	dicht
		b	(–)	–	
		c, d	++	++	dicht
		Zn	(+)	++	
P 10	A	0, a	0	++	dicht
		b, c, d	0	+++	dicht
P 23, P. spec. (Bi- verticillata-symm., Ascogena)	A	0, a, b, c, d	++	++	dicht
P 32, P. aureo- limbum ZAL.	A	0, a—d, Zn	++	++	großkugelig
P 41, P. spec. (Bi- verticillata-symm., Luteo-purpurogena)	A	0, a, b, d	+++	++	breiartig
		c	(+)	++	grießförmig
P 54, P. spec. (Bi- verticillata-symm., Luteo-purpurogena)	A	0	+++	++	klein-kugelig
		a	+	++	klein, stachelförm.
		b, c, d	(+)	++	grießförmig
P 69	A	0, a, b, d	+++	++	flockig-dicht
P 78, P. griseo- brunneum SOPP	A	0, a, b, d	0	+++	breiartig, dicht
P 86	A	0, a	0	+	milchig
		b, d	0	++	dicht
P 91	A	0, b	+++	++	grob-grießförmig
		a	+++	++	kleinkugelig
		d	+++	++	grießartig
P 107	A	0	+++	++	milchig-schleimig
		a	+++	+	milchig-schleimig
		b	+++	++	grießförmig
		d	0	+++	dicht
P 124	A	0, a	(+)	++	grießförmig
		b	+	++	großkugelig u.
		d	+	++	schleimig
		Zn	(+)	++	grießförmig feinblättrig

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Pilz-Stamm	Nähr- medium	Zusätze	Conidien- menge	Mycel	
				Menge	Form
P 130	A	0	0	+++	sehr dicht
		a	0	++	kugelförmig
		b, d, Zn	0	+++	sehr dicht
P 156	A	0, a, b, d	+++	++	flockig
		Zn	+++	++	kugelförmig
P 169	A	0, a, b, d	0	++	kleinkugelig
P 176, <i>P. baculatum</i> WESTL.	A	0, a, b, d, Zn	+++	++	
	B	Mz	0	(+)	
	B	Rz	0	++	
	C	0	+++	++	
P 211, <i>P. notatum</i> WESTL.	A	0, a, b, d	0	++	kugelförmig
P 214, <i>P. luteum</i> ZUKAL	A	0	(+)	+	feinflockig
		a, b, d	(+)	++	feinflockig
		Zn	(+)	+	schleimig
P 219, <i>P. purpuro-</i> <i>genum</i> STOLL	A	0, a, b, d	0	++	dicht
	B	Mz	0	+	schleimig
	B	Rz	0	++	dicht
	C, D	0	0	++	dicht
P 226, <i>P. bacu-</i> <i>latum</i> WESTL.	A	0, a, b, d	++	++	grießförmig
P 228, <i>P. citreo-</i> <i>roseum</i> DIERCKX	A	0, a, b, d	+++	++	kugelförmig
P 334	A	0, a, d, Zn	+	++	dicht
		b	(+)	++	dicht
	B	Mz	0	(+)	
	B	Rz	0	(+)	
	C	0	(+)	+	
P 412, <i>P. sangui-</i> <i>neum</i> SOPP	A	0	(+)	++	kugelförmig
P 427, <i>P. rubrum</i> , GRASSBERGER- STOLL	A	0, Zn, Mn	(+)	++	großkugelig
	D	0	(+)	++	großkugelig

(Medium B) mit Milchzucker (Mz) oder Rohrzucker (Rz), die RAULIN-Nährlösung (Medium C) und Maiswürze (Medium D) benützt (vgl. dazu voranstehende Mitteilung). Die Versuchsdauer betrug stets 14 Tage, die Temperatur 26° C. Die Beobachtungen über Mycel- und Conidienbildung wurden bei Versuchsabbruch protokolliert. Es wurde natürlich streng auf die Vermeidung von Randmycel geachtet. Die Prüfung auf die Conidienbildung erfolgte mikroskopisch stets an mehreren Proben. Die bei diesen Untersuchungen gemachten Beobachtungen sind in Tab. 1 vermerkt. Hinsichtlich der Herkunft der Pilze vgl. die voranstehende Mitteilung. Die nicht näher bezeichneten Pilzarten gehörten alle zur Gruppe *Biverticillata-symmetrica* des *Penicillium*-Systems.

### Ergebnisse.

1. *Wieweit Beziehungen zwischen der submersen Conidienbildung und dem Ausmaß der Mycelbildung* vorhanden sein mögen, läßt sich bis zu einem gewissen Grad auf statistischem Wege feststellen (vgl. Tab. 2; dabei ist nur das Verhalten der Pilze in dem zumeist benützten Nährmedium A, ohne weitere Zusätze, berücksichtigt, um eine Vergleichsbasis zu haben).

Tabelle 2. *Statistik der Beziehungen zwischen Conidien- und Mycelbildung.*

Menge an Mycel (M) und Conidien (C)	Anzahl der Pilze	Pilzstämme
M +++ C 0	2	P 78, 130
M ++ C 0	4	P 10, 169, 211, 219
M ++ C (+)	3	P 124, 412, 427
M + C 0	1	P 86
M + C (+)	1	P 214
M ++ C +	1	P 334
M ++ C ++	4	P 6, 23, 32, 226
M ++ C +++	8	P 41, 54, 69, 91, 107, 156, 176, 228

Man sieht, daß in 9 Fällen bei normaler bis sehr starker Mycelentwicklung die Conidienbildung entweder fehlte oder nur sehr schwach war. Andererseits fand aber in 12 Fällen bei normalem Mycelwachstum eine starke bis sehr starke Sporulierung statt. Es ist leicht ersichtlich, daß die verschiedensten Mycelmengen mit dem verschiedensten Aus-

maß der Conidienbildung gepaart sein können. Maßgebend ist dabei allein das individuell unterschiedliche Verhalten der Pilze.

2. *Beeinflussung der Conidienbildung durch die Zusammensetzung des Nährmediums.* Soweit diesbezügliche Untersuchungen durchgeführt worden sind, erwies sich die submerse Conidienbildung der meisten Pilze von der Art des Nährmediums weitgehend unabhängig und zwar sowohl bei gut conidienbildenden Pilzen (z. B. 23, 69, 91, 156, 226, 228) als auch bei mangelnder Conidienbildung (P 10, 78, 86, 130, 169, 211, 219, 427). Wohl aber kann die submerse Conidienbildung durch grundsätzliche Änderungen im Nährmedium stark beeinflußt werden (vgl. z. B. 176, Nährmedium B, Rz). Bei einigen Pilzen bewirkte bereits eine kleine Änderung in der Zusammensetzung des Nährmediums eine sehr beträchtliche oder völlige Änderung im Vermögen zur Conidienbildung (vgl. P 54, 107; der  $p_H$ -Wert betrug in allen Fällen 6,0—6,5, sodaß der Unterschied in der Conidienbildung hiermit nicht zusammenhängen kann).

3. *Einfluß von Zink-Ionen.* Während durch überoptimale Zinkgaben in der Oberflächenkultur die Fruktifikation von Pilzen unterdrückt wird (vgl. dazu FOSTER, 1939), fanden wir in 10 untersuchten Fällen nur einmal in Gegenwart großer Zinkgaben eine Verminderung der submersen Conidienbildung (bei P 6). In allen anderen Fällen konnte keine Beeinflussung des Prozesses durch Zink beobachtet werden, und zwar weder bei sehr starker Conidienbildung (P 156, 176), noch bei schwacher (P 334) oder ganz vereinzelter (P 124, 214, 427) oder völlig fehlender (P 130, 219). Nur bei 2 Pilzen (P 169 und 219) wurde durch die zugesetzte große Zinkmenge das Wachstum völlig verhindert.

4. *Beziehungen zwischen der Morphologie des Mycel und der Conidienbildung* konnten nicht beobachtet werden. So fanden sich bei allen Typen des Submersmycel (vgl. Tab. 1) sowohl Conidienbildung als auch keine. — Die in der Submerskultur ausgebildeten Conidienträger waren häufig deformiert. Im mikroskopischen Bild sieht man in manchen Fällen (+++ in Tab. 1) ganze Massen von Conidien, des öfteren kann man auch zusammenhängende Conidienketten feststellen. Ferner konnte beobachtet werden, daß die typische, meist grüne Farbe der „Oberflächen-Conidien“ bei den „Submers-Conidien“ sehr häufig fehlte. In manchen Fällen enthält aber das Submersmycel dichte grüne Conidienmassen.

#### *Diskussion.*

Unsere Beobachtungen über die submerse Conidienbildung durch *Penicillien* erscheinen von morphologischen wie physiologischen, aber auch von praktisch-methodischen Gesichtspunkten aus nicht uninteressant. Die frühere Ansicht, daß die Conidienbildung nur dort stattfinden kann, wo das Mycel mit dem Luftraum in unmittelbare Berührung kommt, ist nun hinfällig geworden. Aber auch die Ansicht, daß es



häufig erst unter ungünstigen Ernährungsbedingungen oder bei fortgeschrittenem physiologischen Alter einer Kultur zu reichlicher Sporulierung kommt, kann keine Allgemeingültigkeit haben. Wie unsere Beobachtungen zeigen, handelt es sich bei der submersen Conidienbildung nicht um einen vereinzelt, nur unter besonderen Ernährungsbedingungen verlaufenden Vorgang, sondern vielmehr um einen weit verbreiteten Prozeß, der weniger durch die Zusammensetzung des Nährmediums, als vielmehr durch die Art der Pilze bedingt ist. Unsere mehr qualitativen Befunde müssen allerdings erst noch durch quantitative Bestimmungen ergänzt werden (Feststellung des Verhältnisses zwischen Mycelgewicht und Conidienzahl).

In genetischer Hinsicht ergibt sich die Frage, ob die „Submers-Conidien“ sich ebenso verhalten mögen, wie die „Oberflächen-Conidien“, die bekanntlich häufig die weitgehende Variabilität bestimmter Eigenschaften von Pilzen bedingen und die bisher ausschließlich zur Gewinnung von Einsporkulturen, künstlichen Mutanten usw. verwendet worden sind. Dazu kommt, daß die Fähigkeit der *Penicillien* zur submersen Ausbildung von Conidien auch in methodischer Hinsicht berücksichtigt werden muß, indem immer dann, wenn rein vegetatives Submersmycel für bestimmte Zwecke verwendet werden soll<sup>1</sup>, unbedingt mikroskopisch zu prüfen ist, ob nicht „Submersconidien“ vorhanden sind.

#### Zusammenfassung.

Von 24 geprüften *Penicillium*-Stämmen bildete die Mehrzahl in der Submerskultur Conidien aus. Dieser Prozeß erwies sich — soweit dies untersucht wurde — von der Art des Nährmediums ziemlich unabhängig. In einigen Fällen konnte aber durch eine Änderung in der Zusammensetzung des Nährmediums das Vermögen zur Ausbildung von „Submers-Conidien“ stark beeinflußt werden. Durch Zink, das in überoptimaler Menge die Fruktifikation von Pilzen in der Oberflächenkultur zumeist unterdrückt, wird die Ausbildung von „Submers-Conidien“ nur sehr selten beeinflußt. Zwischen der Morphologie des Submersmycels und der Conidienbildung ließ sich keinerlei Beziehung auffinden.

#### Literatur.

FOSTER, J. W.: Botan. Rev. **5**, 207 (1939). — FOSTER, J. W., L. E. McDANIEL, H. B. WOODRUFF u. J. L. STOKES: J. Bacter. **50**, 365 (1945). — GILBERT, W. J., u. R. J. HICKEY: J. Bacter. **51**, 731 (1946). — IRRGANG, K.: Z. Naturforschg. **5b**, 150 (1950). — WHIFFEN, A. J., u. G. M. SEVAGE: J. Bacter. **53**, 231 (1947).

<sup>1</sup> Vegetatives Submersmycel erwies sich z. B. zur Konstanthaltung des Penicillinbildungsvermögens von Pilzstämmen geeignet, während bei der Weiterimpfung der Conidien das Penicillinbildungsvermögen rasch abnahm: WHIFFEN u. SEVAGE (1947); vgl. dazu auch IRRGANG (1950).

Aus der Pädagogischen Hochschule „Kant-Hochschule“ Braunschweig.

## Entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen an Ascomyceten.

III. *Sphaerotheca humuli* (DC.) Burr. auf *Bidens tripartitus* L.  
und

IV. *Erysiphe cichoracearum* DC. auf *Plantago media* L.

Von

RICHARD BEATUS.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Dezember 1949.)

In der vorliegenden Abhandlung habe ich *Sphaerotheca humuli* (DC.) Burr. und *Erysiphe cichoracearum* DC. einer eingehenden Bearbeitung unterzogen. Über beide Arten liegen bereits Beobachtungen vor, insbesondere über *Sph. humuli*. Nachdem aber das Studium von *Sph. mors-uvae* als Besonderheit die Feststellung erbrachte, daß hier zwei Entwicklungsmöglichkeiten vorhanden sind, von denen allerdings nicht beide gleich häufig eingeschlagen werden, schien es wünschenswert, noch andere Vertreter der Erysiphaceen zu studieren, um einen unmittelbaren Vergleich zu bekommen.

Außerdem ist bekannt, daß *Sph. humuli* (DC.) Burr. (= *Sph. Castagnei* Lévy.) einen Formenkreis darstellt, der bei genauerer Durchsicht zweifellos in verschiedene Arten aufzuteilen ist. Dadurch dürften manche voneinander abweichende Angaben über diese Art ihre Erklärung finden. Auch diese Tatsachen bewogen mich, *Sph. humuli* noch einmal entwicklungsgeschichtlich cytologisch zu verfolgen, und ich glaube, die gewonnenen Ergebnisse rechtfertigen dies.

Dasselbe gilt, wenn auch in geringerem Maße für die Gattung *Erysiphe*. Über *Erysiphe cichoracearum* speziell liegt nur wenig Literatur vor (DANGEARD, 1897; YARWOOD, 1935).

### Material und Methodik.

*Sphaerotheca humuli* (DC.) Burr. fand ich im September 1948 in der Umgebung Braunschweigs. Die Wirtspflanze, *Bidens tripartitus* L., wuchs am Ufer eines Teiches. Der Befall durch *Sph. humuli* war 1948 recht allgemein, was ich an verschiedenen Standorten feststellen konnte. Eine Nachuntersuchung 1949 zeigte eine wesentlich geringere Menge kranker Pflanzen.

*Erysiphe cichoracearum* DC. ist auf *Plantago media* L. sehr häufig anzutreffen. Das von mir untersuchte Material stammt von Exemplaren, die in Vorgärten und ähnlichen Orten gediehen.

Die befallenen Blattstücke wurden 36 Std in CARNOYScher Lösung fixiert. Leider ist es mir nicht gelungen, das für diese Zwecke bessere FLEMMINGSche Fixiergemisch zu erhalten. Die  $10\ \mu$  dicken Schnitte wurden wieder nach HEIDENHAIN gefärbt.

Die Untersuchung erfolgte mit einem binokularen Mikroskop von LEITZ. Sämtliche Zeichnungen sind bei 170 mm Tubuslänge und mit dem großen ABBESchen Zeichenapparat hergestellt. Als Optik stand mir  $\frac{1}{12}$  Fluorit Öl-Immersion (95:1) und Okular  $10\times$  zur Verfügung. Die damit erreichte Vergrößerung beträgt 1450mal.

### 1. *Sphaerotheca humuli* (DC.) Burr.

GÄUMANN (1949) teilt die *Erysiphaceen* bezüglich der Weiterentwicklung des Ascogons nach dem Zustandekommen der Paarkernphase in drei Gruppen auf: Bei der ersten Gruppe bildet das Ascogon selbst einen Ascus. Bei der zweiten Gruppe wächst die paarkernige subterminale Zelle des Ascogons zu ascogonen Hyphen aus und bei einer dritten Gruppe verflechten sich die mehrkernigen Zellfäden im Innern des Fruchtkörpers zu einem dichten Knäuel, dessen mittlere Zellen später degenerieren. Dadurch entsteht ein Hohlraum, an dessen Grunde ascogene Hyphen auftreten, deren eigentlicher Ursprung noch unbekannt ist (nach GÄUMANN 1949, S. 131 ff.).

Für die erste Gruppe ist die Gattung *Sphaerotheca* bis jetzt der einzige Vertreter. Hier bildet das Ascogon also selbst den Ascus. Nach den Arbeiten von HARPER an *Sph. Castagnei* Lévy stellt das Ascogon einen mehrkernigen Schlauch dar, der sich in mehrere einkernige und eine subterminale zweikernige Zelle gliedert, die unter Verschmelzung ihres Kernpaares zum Ascus wird. 1927 erschien noch eine Untersuchung von I. HEIN über dasselbe Objekt, wodurch die Ergebnisse von HARPER bestätigt werden.

Eine Besprechung dieser Literatur und einen Vergleich mit meinen Untersuchungen an *Sph. mors-uvae* habe ich bereits 1948 gegeben. Die von BERGMANN 1941 veröffentlichte Arbeit über *Sph. fuliginea*, die mir bei meiner Abhandlung über *Sph. mors-uvae* leider noch nicht bekannt war, stimmt im wesentlichen mit den Befunden von HARPER und I. HEIN an *Sph. Castagnei* überein: Bei *Sph. fuliginea* teilt sich das Dikaryon ein einziges Mal, so daß vier Tochterkerne entstehen. Diese werden so voneinander getrennt, daß eine zweikernige und zwei einkernige Zellen zustandekommen. Die paarkernige Zelle wächst zu einem achtsporigen Ascus aus. Eine erneute Diskussion möchte ich erst am Schluß dieser Mitteilung, nach Niederlegung der eigenen Beobachtungen an *Sph. humuli* vornehmen (vgl. S. 265).

Bei der Beschreibung von *Sph. mors-uvae* habe ich auf die Besonderheit hingewiesen, daß zwei Entwicklungsmöglichkeiten vorhanden sind, von denen eine fast ausschließlich verwirklicht wird. Die Ergebnisse seien hier noch einmal kurz wiederholt. Nach dem Zustandekommen des Zweikernstadiums entstehen mehrere zweikernige Zellen. Da aber bei *Sphaerotheca* nur ein einziger Ascus zur Ausbildung gelangt, sind diese zweikernigen Zellen bis auf eine überflüssig. Aus diesem Grunde erfolgt wieder ein Rückbildungsprozeß, die Zellwände werden aufgelöst und die Kerne degenerieren bis auf ein Paar.

*Wichtig ist die Bildung mehrerer zweikerniger Zellen.*

Daneben gibt es noch eine viel einfachere Entwicklung: Das zweikernige Ascogon wird ohne Zwischenschaltung von Kern- und Zellteilungen zum Ascus.

Wie liegen nun die Verhältnisse bei *Sph. humuli*? Die Bildung der Sexualorgane sowie den Übertritt des männlichen Kernes aus dem Antheridium in das Oogonium habe ich nicht besonders verfolgt. Nach

DANGEARD soll die Befruchtung bei *Sph. humuli* auf *Humulus* und bei anderen *Erysiphaceen* unterbleiben, da der männliche Kern im Antheridium bereits degeneriert. Das Verhalten soll aber recht verschieden sein.

Für *Sph. humuli* auf *Bidens* möchte ich annehmen, daß eine Befruchtung stattfindet. Aus der Literatur ist bekannt, und meine Untersuchungen an *Perisporium* und *Sph. mors-wuae* sind eine weitere Bestätigung dafür, daß der Antheridiumkern in der Regel kleiner ist als

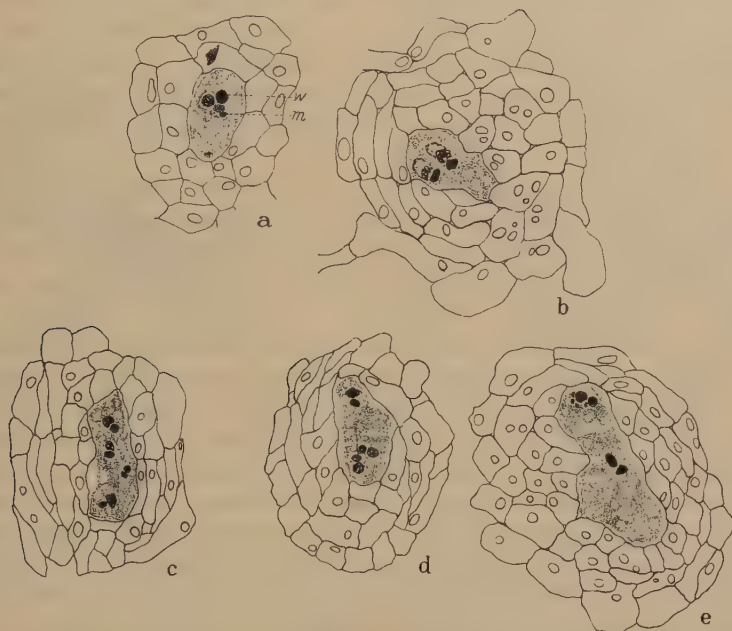


Abb. 1. *Sphaerotheca humuli*, die Entwicklung des Ascogoniums zum Ascus unter Zwischenschaltung einer Paarkernphase, die aus 1 (-2) Zellen besteht. a) zweikerniges Ascogonium, m und w die beiden verschieden großen Sexualkerne; b) die beiden Kerne des Ascogons teilen sich; c) Ascogon mit vier Kernen; d und e) zweizelliges Ascogon mit je einem Kernpaar, die Partner haben sich einander genähert, eine der beiden Zellen ist meist größer (725  $\times$ ).

der Oogoniumkern. Bei unserem Objekt, *Sph. humuli*, weisen die Kerne in den jungen, zweikernigen Oogonien ebenfalls solche Differenzen auf. Abb. 1a gibt diesen Zustand wieder. Der Größenunterschied zwischen den beiden Kernen ( $w$  = Ascogonkern,  $m$  = Antheridiumkern) ist deutlich erkennbar. Ich möchte daher doch die Vermutung aussprechen, daß bei *Sph. humuli* auf *Bidens* ein Kernübertritt aus dem Antheridium in das Ascogonium stattfindet.

In Abb. 1a sind um das zweikernige Ascogon bereits die ersten Hüllfäden gelegt. Sie sind meist einkernig, aber schon wenig später, wenn der Fruchtkörper heranwächst, treten auch zahlreiche zwei- und mehrkernige Hüllzellen auf (Abb. 1b).



Genau wie bei *Sph. mors-uvae* verläuft jetzt die Weiterentwicklung in zwei Richtungen, von denen wiederum die eine sehr viel häufiger ist als die andere. Wir verfolgen zuerst diejenige, die an *Sph. mors-uvae* anschließt.

Das Ascogon ist in jungen, quergeschnittenen Fruchtkörpern eine meist in der Mitte liegende, große, dicht mit Plasma gefüllte Zelle, die in der Regel auch dunkler gefärbt ist als die umliegenden Zellkörper. Die Kernzahl beträgt zwei. Die übrigen Zellen im Innern des Peritheciums können ebenfalls zwei oder noch mehr Kerne enthalten und sind in jüngeren Fruchtkörpern auch noch plasmareich, doch sind die Kerne und die ganze Zelle kleiner als das Ascogonium. Es fällt jedenfalls sofort auf, daß die inmitten des Fruchtkörpers liegende Zelle etwas Besonderes ist.

Die beiden Sexualkerne teilen sich nun simultan (Abb. 1b). Das Ergebnis sind vier Kerne (Abb. 1c). Auf die Kernteilung folgt eine Zellteilung, wie aus den Abb. 1d und 1e klar hervorgeht. Jede Zelle erhält ein Kernpaar. Dabei ist oft zu beobachten, daß eine der beiden Zellen größer ist als die andere (Abb. 1e).

Jene mehrzellige Hyphe aus einkernigen und einer subterminalen Zelle, die allein zweikernig sein soll und die von HARPER und I. HEIN für *Sph. Castagnei* und zuletzt von BERGMANN für *Sph. fuliginea* angegeben wird, habe ich nicht beobachtet. Ich habe vereinzelt Präparate gefunden, in denen die eine der beiden Zellen nur einen Kern besitzt. Diese Funde sind aber im Vergleich zu der Häufigkeit der zweikernigen Zellen gering.

Nach dieser ersten Kern- und Zellteilung erfolgt im allgemeinen keine mehr. In ganz wenigen Fruchtkörpern habe ich drei zweikernige Zellen festgestellt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von BERGMANN macht also das Kernpaar bei *Sph. humuli* auf *Bidens* nur eine einzige Teilung durch, die aber im Gegensatz zu *Sph. fuliginea* zwei zweikernige Zellen liefert.

Die größere der Zellen wird zur Ascusanlage, und ihre Kerne bilden nach der Verschmelzung den primären Ascuskern. Was geschieht nun aber mit der anderen Zelle und ihren beiden Kernen? Bei *Sph. mors-uvae* degenerieren die überzähligen Kerne, nachdem die Zellgrenzen aufgelöst worden sind. Dasselbe geschieht auch hier. Da es sich aber nur um ein, seltener zwei Kernpaare handelt, sind die Bilder, auf denen die Kerndegeneration zu sehen ist, nicht so augenfällig (Abb. 2). Die Zeichnungen stellen den jungen Ascus mit dem primären Ascuskern dar, der uns aber im vorliegenden Fall weniger interessiert. Wichtiger erscheinen mir die Kernfragmente, die meist am Rande eines Ascus anzutreffen sind. In Abb. 2a und 2b sind die degenerierenden Kerne mit  $\times$  versehen. In späteren Stadien sind diese Chromatinreste vom Plasma resorbiert und damit verschwunden.

Eine andere Beobachtung möchte ich hier noch erwähnen, die in fast allen Präparaten zu machen ist. Teilt sich der primäre Ascuskern, so finden sich in seiner unmittelbaren Umgebung im Plasma Chromatinstücke in verschiedener Zahl und Größe. Diese Kernbrocken werden ebenfalls resorbiert und sind später nicht mehr nachzuweisen. Auch bei den folgenden Teilungsschritten des Ascuskernes sind mitunter noch Chromatinausstoßungen zu verzeichnen, aber nicht mehr in der gleichen

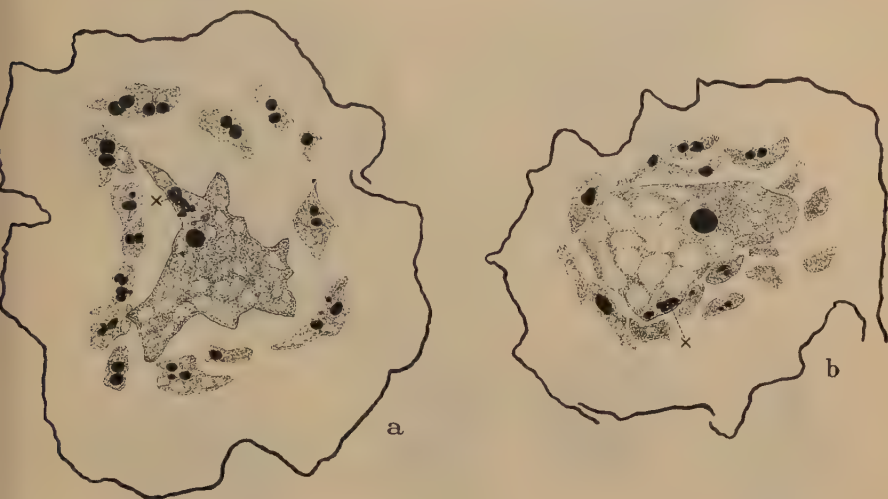


Abb. 2. *Spherotheca humuli*, die Entwicklung des Ascogons zum Ascus unter Zwischenschaltung einer Paarkernphase, die aus 1 (-2) Zellen besteht. Nachdem durch Auflösung der Zellwand die Einzelligkeit des Ascogons hergestellt ist, wird das überzählige Kernpaar resorbiert. Bei  $\times$  die degenerierenden Kerne, vgl. Text S. 256. (Die Zellen der Perithecienvand sind hier und in den folgenden Abb. nicht mehr gezeichnet) (725 $\times$ ).

Häufigkeit wie bei der ersten Teilung. Über Ursache und Bedeutung dieser Erscheinung vermag ich noch nichts auszusagen.

Im Gegensatz zu *Sph. mors-uvae* ist die eben beschriebene Art der Ascusentstehung bei *Sph. humuli* nicht die übliche. Sie erfolgt im allgemeinen nach der in Abb. 3 veranschaulichten Form. Dieser Entwicklungsgang ist so häufig, daß man ihn als den normalen ansprechen kann.

Nach dem Übertritt des Antheridiumkernes vergrößert sich das Ascogonium sehr stark (Abb. 3 a). Irgendwelche Anzeichen für eine Kern- und Zellteilung sind nicht zu erkennen. Abb. 3b bringt die eigentliche Befruchtung, die Verschmelzung der beiden Sexualkerne zum primären Ascuskern (Abb. 3c). Er liefert in zwei Teilungsschritten den vierkernigen Ascus (Abb. 3 d, 3 e und 3 f). Gleichzeitig geht eine Vergrößerung des Peritheciums und eine Veränderung seiner Zellen vor sich. Sie werden mehr und mehr inhaltsleer und nehmen eine braune Färbung an.

Eine nochmalige Kernteilung läßt aus dem vierkernigen Ascus den achtkernigen hervorgehen. Jeder der Kerne umgibt sich mit einer Plasmamenge und grenzt sich durch eine Membran gegen das Restplasma des Ascus ab. Abb. 4 zeigt sechs derartige Sporenanlagen.

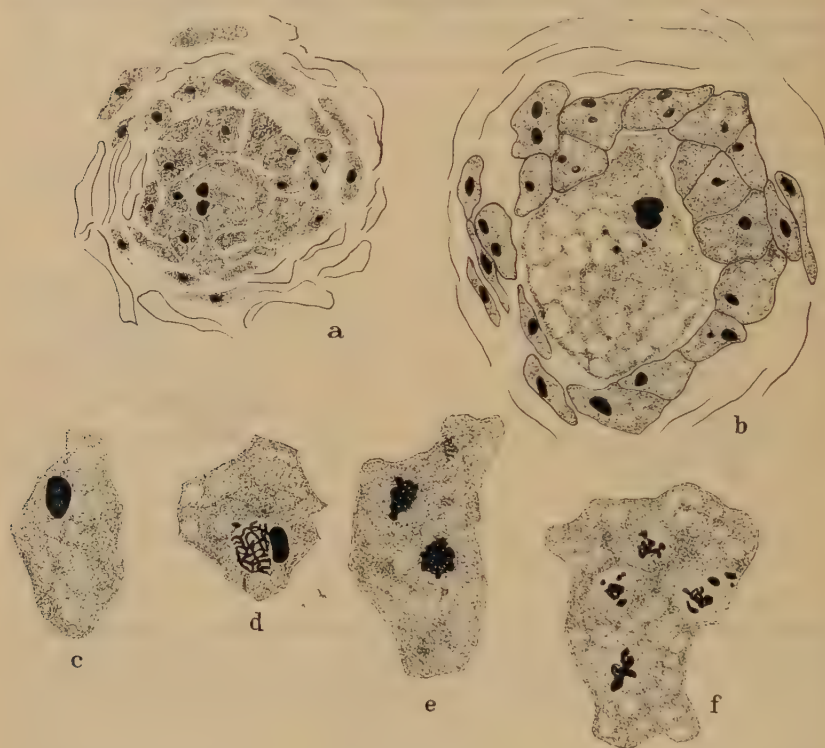


Abb. 3. *Sphaerotheca humuli*, die Entwicklung des Ascogoniums (Zygote) unmittelbar zum Ascus. *a* zweikerniges Ascogon; *b* Kernverschmelzung; *c* der primäre Ascuskern; *d* erste Teilung des primären Ascuskernes; *e* zweikerniger Ascus; *f* vierkerniger Ascus. (In *c*, *d*, *e* und *f* ist jeweils nur der Ascus dargestellt) (870  $\times$ ).

Die Ascusentstehung ist also hier wesentlich vereinfacht. Das zweikernige Ascogon wird direkt zur Ascusanlage und weiter zum Ascus. Eine Kern- und Zellteilung unterbleibt. Wie aus den Abb. ersichtlich ist, sind in der Umgebung des Ascogons Zellen mit zwei oder noch mehr Kernen vorhanden, sie haben aber nach meinen Beobachtungen entstehungsmäßig keinerlei Beziehung zum Ascogon, sondern gehen auf Hüllzellen zurück.

Vergleichen wir noch einmal kurz den Entwicklungsgang von *Sph. mors-uvae* und *Sph. humuli* auf *Bidens* miteinander, so besteht der Unterschied darin, daß bei *Sph. mors-uvae* mehrere zweikernige Zellen

gebildet werden und bei *Sph. humuli* nur zwei. Der vereinfachte Entwicklungsablauf, wonach aus dem zweikernigen Ascogonium ohne Zwischenschaltung von Kern- und Zellteilungen der einzige Ascus hervorgeht, ist bei beiden Arten gegeben. Sie weichen voneinander ab, indem

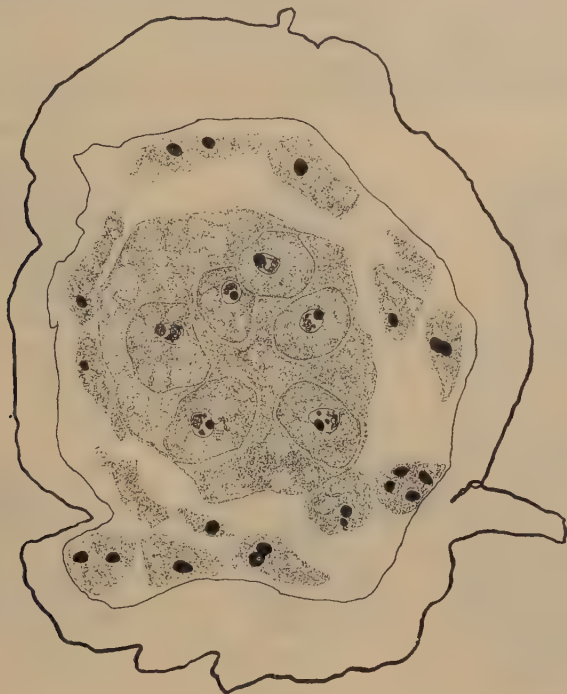


Abb. 4. *Sphaerotheca humuli*, Schnitt durch einen Fruchtkörper. Der Ascus zeigt sechs Sporenanlagen, die beiden fehlenden Sporen sind im Schnitt nicht getroffen. (960x.)

bei *Sph. mors-uvae* der vereinfachte Entwicklungsablauf selten und bei *Sph. humuli* die Regel ist. Der Weg über die dazwischen geschaltete Paarkernphase ist bei *Sph. mors-uvae* als Normalfall und bei *Sph. humuli* als Seltenheit anzutreffen.

## 2. *Erysiphe cichoracearum* DC.

Um einen unmittelbaren Vergleich zu der Entwicklung von *Sph. humuli* zu haben, habe ich noch *Erysiphe cichoracearum* DC. untersucht. DANGEARD hat auch diese Art (auf *Sonchus* als Wirtspflanze) in der Liste jener Formen stehen, bei denen keine Befruchtung erfolgt, da der männliche Kern vorher im Antheridium zugrunde geht. Ähnlich wie bei *Sph. humuli* habe ich bei *E. cichoracearum* auf *Plantago* diese frühen Stadien nicht näher verfolgt, so daß ich keine endgültige Ent-



scheidung in dieser Frage fällen kann. Auffallend ist jedoch, daß die zwei Kerne im Ascogon, genau wie bei *Sph. humuli* und *Sph. mors-uae*, Größenunterschiede aufweisen, was auf einen Antheridien- und einen Oogonienkern schließen läßt (Abb. 5 a, w und m). Der Befund von YARWOOD bei derselben Art auf *Helianthus* spricht gleichfalls für einen echten Sexualvorgang.

GÄUMANN faßte 1926 *Erysiphe* und *Phyllactinia corylea* zu einem besonderen (ersten) Entwicklungstyp zusammen. Hierbei geht aus dem Ascogon eine dicke,

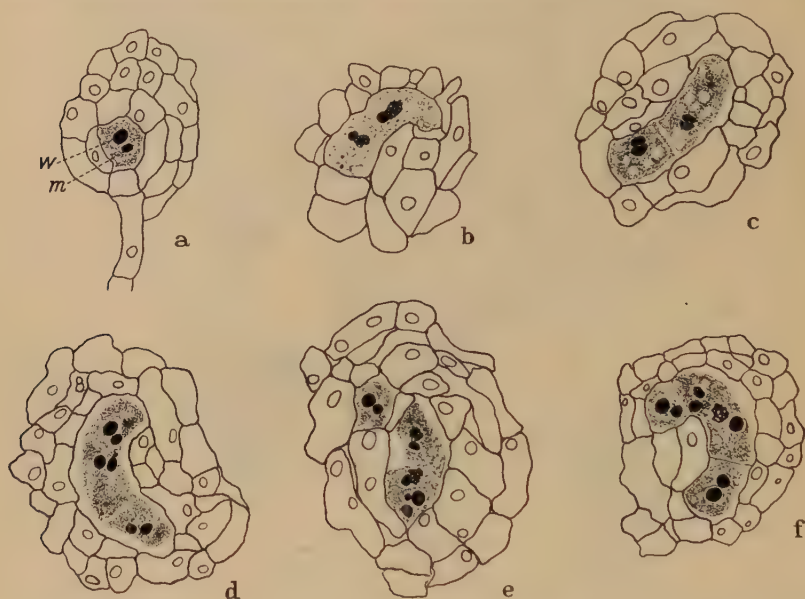


Abb. 5. *Erysiphe cichoracearum*, die Entwicklung des Ascogons zu einer dicken, mehrzelligen Hypher. a zweikerniges Ascogon, m und w die beiden verschieden großen Sexualkerne; b die vergrößerte Ascogonzelle, die beiden Kerne teilen sich; c zweizelliges Ascogon mit einem Kernpaar je Zelle, die Kerne liegen dicht beieinander; d, e und f das Ascogon ist zu einer mehrzelligen, dicken Hyphe herangewachsen. Jede Zelle besitzt ein Kernpaar (870  $\times$ ).

mehrzellige Hyphe hervor. Ein Teil der Zellen ist zweikernig, ein anderer Teil ist einkernig. Für *E. Martii* speziell entstehen mehrere zweikernige Zellen und entsprechend auch mehrere ascogene Hyphen. Für *E. communis* gibt HARPER einen unseptierten Schlauch mit fünf bis acht Kernen an. Eine Zellwandbildung erfolgt erst später und stets so, daß die vorletzte Zelle zweikernig ist. Dies ist die primäre ascogene Hyphe.

1938 berichtet COLSON über die Entwicklung und Cytologie von *Phyllactinia suffulta* (Rebent.) Sacc. Danach ist das Ascogon zweikernig. Eine Befruchtung hat aber nicht stattgefunden, da der männliche Kern im Antheridium vorher degeneriert. Die beiden Kerne des Ascogons teilen sich und aus den vier Tochterkernen entstehen zwei einkernige und eine subterminale zweikernige Zelle. Diese wird durch weitere Kernteilungen mindestens achtkernig. Aus ihr entspringen ungegliederte ascogene Hyphen, in die die Kerne einwandern. Die Kernteilungen kommen aber

damit noch nicht zum Stillstand. Die Seitenäste der ascogenen Hyphen werden durch Querwände in eine einkernige Spitzenzelle und zweikernige Zwischenzellen gegliedert. Die oberste dieser paarkernigen Zellen wird jeweils zu einem Ascus.

*Phyllactinia* ist der Vertreter der 1949 von GÄUMANN aufgestellten zweiten Entwicklungsgruppe unter den *Erysiphaceen* (vgl. diese Arbeit S. 254).

Der Zusammenhang zwischen *Phyllactinia* und *E. communis* ist unverkennbar: In beiden Fällen tritt die subterminale paarkernige Zelle auf. Die Beziehung

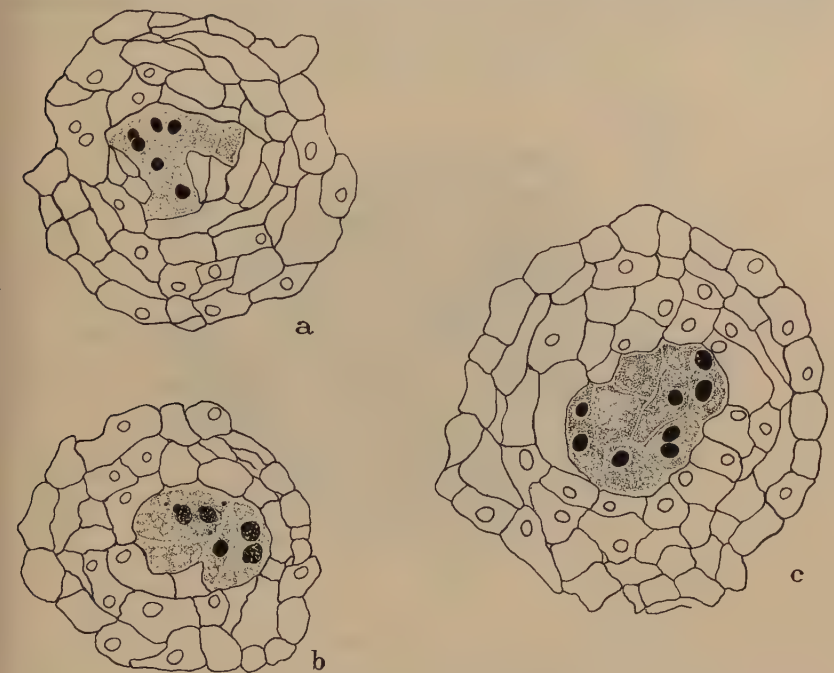


Abb. 6. *Erysiphe cichoracearum*, Schnitte durch junge Perithezien. a und b Schnitte durch denselben Fruchtkörper mit 5 zweikernigen und 1 einkernigen Zelle, sowie 3 kernlosen Zellstücken; c Schnitt durch einen jungen Fruchtkörper mit 3 zweikernigen und 2 einkernigen Zellen, sowie 2 kernlosen Zellstücken (960 ×).

zu *E. Martii* ist ebenfalls vorhanden, nur daß eben hier noch mehrere zweikernige Zellen zu verzeichnen sind.

*E. cichoracearum* schließt sich in seinem Verhalten an *E. Martii* an. Wie aus Abb. 5 b hervorgeht, teilen sich die Kerne des Ascogons simultan. Das Ergebnis sind zwei Kernpaare, deren Partner sehr dicht beieinander liegen. Gleichzeitig hat sich auch das Ascogon in zwei Zellen geteilt (Abb. 5 c). Das Produkt der ersten Teilung sind demnach zwei zweikernige Zellen.

Es entsteht so die dicke, mehrzellige Hyphe (Abb. 5 d, 5 e und 5 f), wie sie aus der Literatur bekannt ist. Ihre Zellen sind aber zweikernig. Die Kern- und Zellteilungen sind aber noch nicht zu Ende, sondern

gehen weiter, wie die Abb. 6a, 6b und 6c erweisen. Abb. 6a und 6b sind Schnitte durch denselben Fruchtkörper. Wir können insgesamt fünf zweikernige, eine einkernige und drei kernlose Zellen unterscheiden. In Abb. 6c sind sieben Zellen angeschnitten, drei sind zweikernig, zwei einkernig und zwei kernlos.

Hier treten auch Zellen mit nur einem Kern auf. Sie zeigen aber gegenüber der zweikernigen Zelle nie eine Lage, wonach man die paarkernige

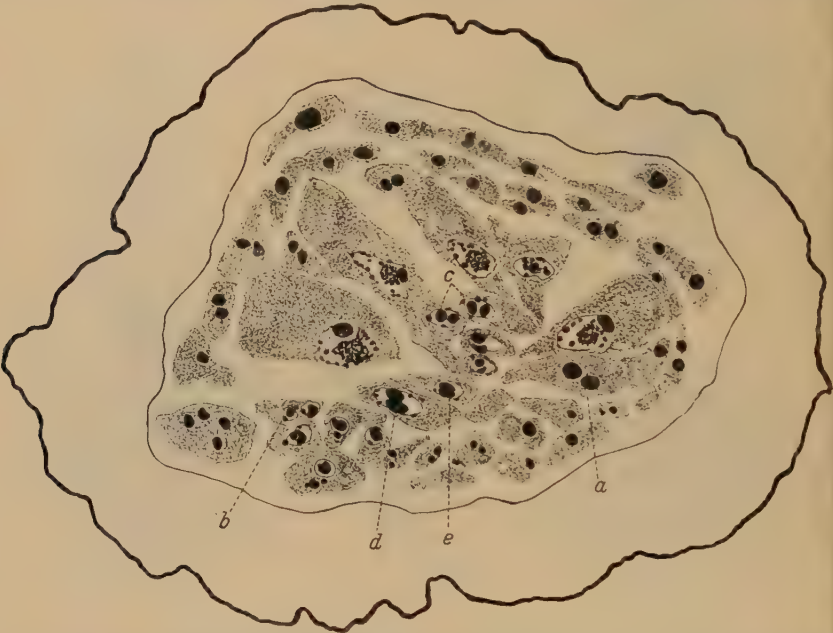


Abb. 7. *Erysiphe cichoracearum*, Querschnitt durch ein Perithecium mit jungen Asci. Der primäre Ascuskern befindet sich meist in Teilung. Am Grunde und zwischen den Schläuchen noch weitere zweikernige Zellen, aus denen die Asci hervorgehen. Die beiden Kerne in verschiedenen Stadien der Verschmelzung, vgl. Text S. 263. (Hier und in den folgenden Abb. sind die Zellen der Peritheciwand nicht mehr gezeichnet.) (960x.)

Zelle als subterminal bezeichnen könnte. Es ist nicht ausgeschlossen, daß diese einkernigen Zellen in Wirklichkeit gleichfalls zwei Kerne besitzen. Da die Partner meistens sehr eng zusammen- oder aufeinanderliegen, kann ein Kern der Beobachtung entgehen. Die kernlosen Stücke sind so zu erklären, daß die Zellen gewunden sind und im Schnitt zweimal getroffen wurden. Das Kernpaar ist dann nur auf einem Anschnitt vorhanden.

Ich möchte auch für *E. cichoracearum* die Auffassung vertreten, daß die vom Ascogon sich ableitenden Zellen in der Regel zweikernig sind. Es mag vorkommen, daß auch einmal einkernige Zellen entstehen, sie sind aber selten.

Das weitere Schicksal dieser zweikernigen Zellen geht aus Abb. 7 hervor. Der Fruchtkörper ist beträchtlich in die Größe gewachsen, die Wandzellen, zwar noch einzeln erkennbar, sind größtenteils leer und ihre Wandungen braun gefärbt. Im Innern des Peritheciums sieht man junge Schläuche mit einem Kern, der sich meist in Teilung befindet. Woher kommen diese jungen Asci? An ihrem Grunde und zum Teil auch zwischen ihnen sind zweikernige Zellen verschiedener Größe vor-

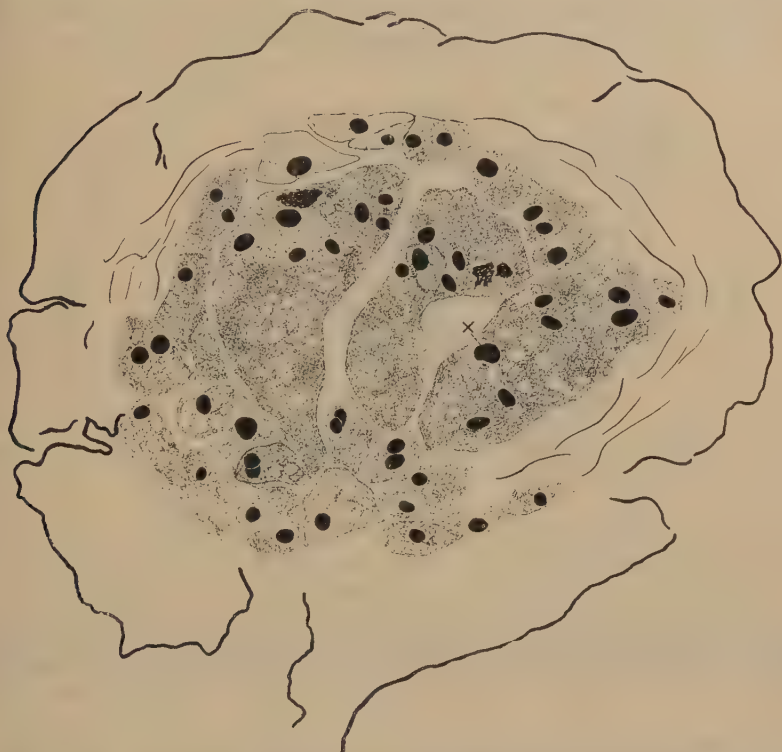


Abb. 8. *Erysiphe cichoracearum*, Schnitt durch einen Fruchtkörper mit drei Schläuchen, die meist acht Kerne besitzen. Die mit x bezeichnete Kernmasse besteht wahrscheinlich aus zwei Kernen. (960x.)

handen. Eine allen zukommende Form gibt es nicht. Einzelne sind langgestreckt, andere spindelförmig, andere wieder mehr rundlich. Einzelne lassen noch beide Kerne erkennen, während andere das Stadium der Kernverschmelzung zeigen. Wir haben in diesen zweikernigen Zellen die Ascusanlagen vor uns, in denen die Caryogamie eintritt. Aus der Zahl der jungen Asci und der Zahl der noch vorhandenen zweikernigen Zellen, sowie aus der Zahl der Asci im reifen Fruchtkörper ist zu schließen, daß das zweikernige Ascogon eine ganze Reihe von Kern- und Zellteilungen durchmacht, bzw. die ascogenen Hyphen sich verzweigen.



Die Kernverschmelzung ist in Abb. 7 in verschiedenen Stadien zu sehen. Es gibt Kerne, die völlig isoliert (a) nebeneinanderliegen, in anderen Zellen sieht man deutlich um jeden Kern eine ausgebildete Kernmembran, wobei sich die Kernwandungen bereits berühren (b) und schließlich ist nur eine Wand um die beiden Nucleolen (c), die in ungleicher Entfernung voneinander sich befinden, oder gar schon miteinander vereinigt sind (d und e).

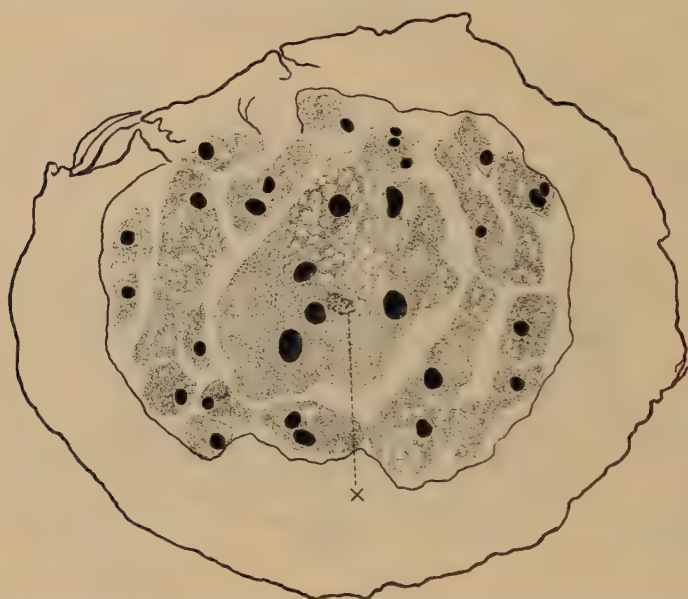


Abb. 9. *Erysiphe cichoracearum*, Schnitt durch einen Fruchtkörper. Der im Schnitt getroffene Ascus hat vier Sporen ausgebildet und drei überzählige Kerne (ein überzähliger Kern liegt bei  $\times$  auf der untersten Spore und ist in der Zeichnung nur angedeutet) (960 $\times$ ).

Der primäre Ascuskern macht drei Teilungen durch, deren Ergebnis acht Kerne sind. Abb. 8 zeigt den Querschnitt durch ein älteres Perithecium mit drei großen, langgestreckten Zellen, den Schläuchen. Der linke Ascus läßt acht Kerne erkennen, von denen einer durch schlechtere Färbbarkeit und unregelmäßigen Umriß auffällt. Im mittleren Ascus sind fünf Kerne, eine Spindel und ein schlecht färbbarer Kern, und der Schlauch ganz rechts enthält sieben Kerne, dabei ist nicht ganz sicher, ob es sich bei dem größeren Einzelkern ( $\times$ ) nicht um zwei Kerne handelt.

Diese Tatsache, daß aus dem primären Ascuskern acht Kerne hervorgehen, ist deshalb von Interesse, weil der Ascus bei *E. cichoracearum* nur zwei Sporen enthält, also sechs Kerne überflüssig sind. Angelegt werden aber acht Kerne, als ob auch acht Sporen ausgebildet würden

wie im Normalfall. Diese Zahl scheint nicht immer erreicht zu werden. Man beobachtet neben achtkernigen Asci auch vierkernige und findet entsprechend Asci mit zwei Sporen und sechs überzähligen Kernen und einzelne Schläuche mit zwei Sporen und zwei überzähligen Kernen.

Umgekehrt liegt die Frage nahe, ob aus den gebildeten acht Kernen nicht auch einmal mehr als zwei Sporen hervorgehen können. Unter meinen sehr zahlreichen Präparaten habe ich einen einzigen solchen Fall gefunden. Er wird in Abb. 9 gezeigt. In dem in der Mitte des Peritheciums gelegenen Ascus sind drei überzählige Kerne zu zählen (ein Kern

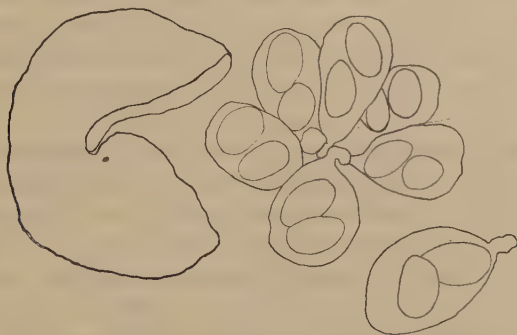


Abb. 10. *Erysiphe cichoracearum*, Quetschpräparat eines reifen Fruchtkörpers mit einem Teil der Schläuche. Die Asci enthalten zwei Sporen ( $580\times$ ).

liegt auf der untersten Spore, in der Zeichnung mit  $\times$  versehen) und vier angelegte Sporen. Es ist der einzige Fund geblieben. Abb. 10 gibt schließlich noch ein Quetschpräparat eines reifen Fruchtkörpers, bei dem aber nicht sämtliche Asci gezeichnet sind. Meist ist die Zahl der Schläuche je Perithecium über ein Dutzend. Auch hier habe ich in allen Fällen nur zwei Sporen im Ascus festgestellt. Die Zahl vier scheint wirklich eine Seltenheit zu sein.

### *Besprechung der Ergebnisse.*

Als Grundlage für unsere Diskussion gehen wir von den durch GÄUMANN (1949) aufgestellten Entwicklungstypen aus und beschäftigen uns zuerst mit der Gattung *Sphaerotheca*. Der erste Entwicklungstyp wird nur von dieser Gattung gebildet, und ihm sind in erster Linie die Ergebnisse der Untersuchungen von HARPER zugrunde gelegt: Das Ascogon ist eine mehrkernige Hyphe. Durch simultane Kern- und Zellteilung entstehen mehrere einkernige Zellen und eine subterminale zweikernige Zelle. Deren Kerne fusionieren und ergeben den primären Ascuskern. I. HEIN schreibt dazu (1927, S. 400): "The two nuclei of the ascogone during the development of the perithecium divide once so that there

are four . . . I am of the opinion that these nuclei arose by a simultaneous division of the two nuclei in the ascogone."

In der Besprechung über die Ergebnisse bei *Sph. mors-uvae* schrieb ich in diesem Zusammenhang (1948, S. 49): „Ich bin gleichfalls der Meinung, daß sich die beiden Kerne des Oogoniums (dabei handelt es sich um den weiblichen und männlichen Kern, im Gegensatz zu HEIN) simultan in vier Kerne teilen. Nach HEIN treten nun auch bei *Sph. Castagnei* Lévy. Querwände im Ascogon auf, allerdings derart, daß der obere und der untere Kern von dem in der Mitte liegenden Kernpaar durch eine Zellwand getrennt werden. Darnach entsteht nach der ersten Kern- und Zellteilung des befruchteten Ascogons eine zweikernige Zelle in der Mitte, und darüber bzw. darunter je eine einkernige Zelle.“ Zu demselben Ergebnis kommt im Grunde BERGMANN bei *Sph. fuliginea*.

Ich habe weder bei *Sph. mors-uvae* noch bei *Sph. humuli* die von HARPER, I. HEIN und BERGMANN so betonte subterminale Zelle festgestellt. 1948 habe ich darauf hingewiesen, daß sehr viele Abbildungen, die I. HEIN seiner Arbeit beigelegt hat, sich leicht auch nach der von mir vertretenen Auffassung erklären lassen.

Ich habe in meinen Präparaten unseptierte Hyphen gefunden (vgl. 1948, S. 51, Abb. 8a) mit einer ungeraden Zahl von Kernen. Bei einer nachfolgenden Zellteilung würden einkernige Zellen entstehen. Ich habe auch Perithezien gefunden, in denen tatsächlich eine zweikernige und zwei einkernige Zellen angetroffen wurden: Die zweikernige Zelle lag aber nie subterminal, eine bestimmte Anordnung der ein- bzw. zweikernigen Zellen konnte ich nicht ausmachen. Ich betrachte diese Feststellungen als Ausnahmen, sie fallen gegenüber den anderen Beobachtungen über zweikernige Zellen nicht ins Gewicht.

Ich bin der Meinung, daß *die Zellen, die durch Teilung des zweikernigen Ascogons entstehen, in der Regel zweikernig sind*. Dies gilt sowohl für *Sph. mors-uvae* als auch für *Sph. humuli*.

Wir müssen uns nun noch die Frage vorlegen, welche Bewandnis es mit den beiden Entwicklungsmöglichkeiten bei der Gattung *Sphaerotheca* auf sich hat. 1948 habe ich auf diese Tatsache bereits hingewiesen, ihr aber noch nicht die Bedeutung zugemessen, die sie tatsächlich verdient, nachdem die Untersuchung bei *Sph. humuli* ein ganz ähnliches Ergebnis gezeitigt hat.

Für beide Arten ist neu und von besonderem entwicklungsgeschichtlichem Interesse, daß zwei Entwicklungsrichtungen vorhanden sind, von denen jeweils eine fast ausschließlich zur Verwirklichung kommt.

Die *Euascomyceten* sind dadurch ausgezeichnet, daß zwischen Zygote und Ascus eine Paarkernphase zwischengeschaltet ist. Sie findet im Ascus durch die Kernverschmelzung ihr Ende. Bei den *Protoascomyceten* geht der Ascus direkt aus dem zweikernigen Ascogon hervor. KNIEP

(1928, S. 345) schreibt darüber: „Nur bei den primitiven Typen fällt beides noch in eins zusammen, indem hier der Ascus das direkte Produkt der Zygote ist.“

In der systematischen Anordnung bilden die *Plectascales* die erste Gruppe und die *Perisporiales* die zweite Gruppe der *Eusascomyceten*.

Nach GÄUMANN (1926) schließt der erste Entwicklungstypus der *Erysiphales*, der *Phyllactinia corylea* und *Erysiphe Martii* umfaßt, ohne Schwierigkeiten an die *Plectascales*, speziell an den *Aphanoascus-Penicillium*-Typ an. Auch hier haben wir in der ersten Entwicklungsphase mehrere zweikernige Zellen und als deren Folge mehrere ascogene Hyphen. Das von mir untersuchte *E. cichoracearum* dient als weiterer Beleg für die Richtigkeit der von GÄUMANN vertretenen Auffassung.

Nur möchte ich auch hier annehmen, daß die vom zweikernigen Ascogon abstammenden Zellen zweikernig sind.

Die von HARPER untersuchte *E. communis* scheint hier wieder eine Ausnahme zu machen, indem die zweikernigen Zellen bis auf eine einzige reduziert sind. Daß die *Erysiphaceen* reich an solchen Reduktionen sind, beweist auch die verschiedene Sporenzahl. Bei *E. cichoracearum* kommen nur zwei Sporen im Schlauch vor, es werden aber noch acht Kerne angelegt. Genau wie bei *Sphaerotheca* muß wieder ein Rückbildungsprozeß einsetzen, der zur Resorption der überzähligen Kerne führt.

Wie läßt sich nun aber der *Sphaerotheca*-Typ hier anreihen?

GÄUMANN (1926) betont, daß die Bildung von mehreren zweikernigen Zellen einer allmählichen Reduktion unterliegt, die in *Sphaerotheca* ein Endstadium erreicht hat.

Betrachten wir unter diesem Gesichtspunkt die beiden *Sphaerotheca*-Arten, *Sph. mors-uvae* und *Sph. humuli* (auf *Bidens*), so stellen beide außerordentlich schöne und lehrreiche Beispiele für diese allmähliche Reduktion dar.

Die Entstehung mehrerer zweikerniger Zellen, also die Zwischenschaltung einer Paarkernphase zwischen Zygote und Ascus, ist bei *Sph. mors-uvae* noch die Regel. Die Entwicklung erfolgt am häufigsten nach dieser Weise. Als Zeichen der Reduktion tritt aber auch schon der sehr vereinfachte Entwicklungsgang, wenn auch selten, in Erscheinung, wonach das zweikernige Ascogon direkt zum Ascus wird.

Bei *Sph. humuli* auf *Bidens* ist die Rückbildung zum vereinfachten Typus noch weiter fortgeschritten, da hier am häufigsten und damit im normalen Entwicklungsablauf das zweikernige Ascogon, die Zygote, unmittelbar zum Ascus wird. Anklänge an den fortgeschrittenen Typus kommen dadurch zum Ausdruck, daß nach der Zygote mitunter eine Paarkernphase auftritt, die allerdings nur aus zwei oder höchstens drei Zellen besteht.



In *Sph. humuli* ist also das Endstadium erreicht, das GÄUMANN für diese Reduktionsreihe annimmt. *Sph. mors-uvae* kann man als ein Anfangsglied betrachten. Es ist nicht ausgeschlossen, ja sogar sehr wahrscheinlich, daß bei weiteren Untersuchungen von Vertretern der *Erysiphaceen* die Reihe noch geschlossener wird.

Ich weise an dieser Stelle aber noch einmal darauf hin, daß ich mich mit meinen Ergebnissen in Gegensatz zu HARPER, HEIN und BERGMANN befinde. Nicht nur was den Zeitpunkt der Kernverschmelzung anbetrifft, den ich in den jungen Ascus verlege, sondern auch darin, daß ich weder bei *Sph. mors-uvae* noch bei *Sph. humuli* auf *Bidens* eine mehrzellige Hyphe mit einer subterminalen zweikernigen Zelle als Ascogon gesehen habe.

In diesem Zusammenhang verdient auch noch einmal das von mir bearbeitete *Perisporium funiculatum* Preuß. Erwähnung. 1938 schrieb ich (S. 320): „Überblicken wir noch einmal ganz kurz den Entwicklungsablauf von *Perithecium funiculatum*: Neu und auffallend ist, daß das Oogonium nach dem Übertritt des männlichen Kernes nicht nur Kern-, sondern auch Zellteilungen eingeht. Es entstehen mehrere zweikernige Zellen. Aus diesen gehen durch weitere Kern- aber nicht Zellteilungen die mehrkernigen Ascogone hervor.“

Ein gleiches Verhalten zeigt auch die von SATINA (1923) untersuchte *Magnusia nitida* Sacc., ein Vertreter der *Plectasceen*. Als ursprüngliches Merkmal zeigt *Perisporium* nach dem Zustandekommen des Paarkernstadiums noch die Zellteilungen. Es stellt damit auf der einen Seite den Zusammenhang mit *Erysiphe* und *Sphaerotheca* her, auf der anderen Seite weist es auf *Pyronema confluens*, den klassischen Vertreter der *Euascomyceten*, indem bei *Perisporium* bereits mehrkernige Ascogone gebildet werden, aus denen ascogene Hyphen aussprossen, in die jeweils ein Kernpaar einwandert.

Die Tatsache, daß bei der Gattung *Sphaerotheca* nur ein Ascus im Fruchtkörper entsteht, dürfte mit die Ursache sein, daß der einfache Entwicklungsablauf, von der Zygote gleich zum Ascus, wieder erscheint, denn es wird dadurch der ganze Rückbildungsprozeß der zwischen-geschalteten Paarkernphase erspart.

So stellen die *Erysiphaceen* eine entwicklungsgeschichtlich außerordentlich interessante Gruppe dar. Die von GÄUMANN vertretene Auffassung, die *Erysiphales* als Zweig der *Plectascales* mit den schon mehrfach erwähnten Reduktionserscheinungen zu betrachten, ist durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen durchaus gerechtfertigt.

#### *Zusammenfassung der Ergebnisse.*

##### *1. Sphaerotheca humuli* (DC.) Burr. auf *Bidens tripartitus* L.

*Sph. humuli* (DC.) Burr. auf *Bidens tripartitus* L. hat wie *Sph. mors-uvae* zwei Entwicklungsmöglichkeiten: Die häufigere erfolgt nach dem

einfachen Typus, wonach aus dem zweikernigen Ascogon (Zygote) unmittelbar der Ascus wird.

Das Ascogon ist eine zweikernige Zelle.

Die zweite, seltenere Entwicklungsmöglichkeit besteht in der Einschaltung einer Paarkernphase zwischen Zygote und Ascus.

Die zwischengeschaltete Paarkernphase besteht nur aus ein, seltener zwei Zellen.

Die Zellen, die sich vom zweikernigen Ascogon ableiten, sind in der Regel zweikernig.

Da bei *Sphaerotheca* nur ein Ascus gebildet wird, geht das überzählige Kernpaar (bzw. Kernpaare) zugrunde, nachdem vorher die Zellwand aufgelöst wurde.

Die Caryogamie tritt erst im jungen Ascus ein.

## 2. *Erysiphe cichoracearum* DC. auf *Plantago media* L.

Das zweikernige Ascogon macht eine Reihe von Kern- und Zellteilungen durch. Die Zellen, die sich vom Ascogon ableiten, sind in der Regel zweikernig.

Die Asci nehmen ihren Ursprung aus den zweikernigen Zellen, die vom Ascogon abstammen.

Die Caryogamie tritt erst im jungen Ascus ein.

Der primäre Ascuskern liefert in drei Teilungsschritten einen acht-kernigen Ascus. Da aber jeder Ascus nur zwei Sporen enthält, werden die überzähligen Kerne wieder resorbiert. Es wurden einzelne Fälle beobachtet, in denen je Ascus nur vier Kerne vorhanden waren.

Die an *Sph. humuli* (DC.) Burr. auf *Bidens tripartitus* L. und an *E. cichoracearum* DC. auf *Plantago media* L. gewonnenen Ergebnisse werden mit den früheren Studien über *Sph. mors-uvae* Schwein. und *Perisporium funiculatum* Preuss. verglichen, und die entwicklungsgeschichtlich systematische Bedeutung der erzielten Resultate im Zusammenhang erörtert (vgl. Besprechung der Ergebnisse).

## Literatur.

- ALLEN, R. F.: Journ. of agric. res. **53**, 801 (1936). — BEATUS, R.: Jb. Bot. **87**, 301 (1938); Z. Naturforschg. **3b**, 42 (1948). — BERGMANN, B.: Svensk Bot. Tidskrift **35**, 194 (1941). — CLAUSSEN, P.: Z. Bot. **4**, 1 (1912). — COLSON, B.: Ann. of Bot. N. S. **2**, 381 (1938). — DANGEARD, P. A.: Le Botaniste **5**, 245 (1897); **10**, 1 (1907). — EFTIMIU, P., u. KHARBUSH, S. S.: Le Botaniste **20**, 157 (1928). — GÄUMANN, E.: Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena (1926); Die Pilze. Grundzüge ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie. Basel (1949). — HARPER, R. A.: Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. **13**, 473 (1895); Carnegie Inst. Wash. Publ. Nr. **37** (1905). — HEIN, I.: Bull. of the Torrey Bot. Club **54**, 383 (1927). — KNIPE, H.: Die Sexualität der niederen Pflanzen. Jena (1928). — SATINA, S.: Bot. Arch. **3**, 273 (1923). — WINGE, Ö.: Bull. Soc. mycol. de France **27**, 211 (1911). — YARWOOD, C. E.: Science **82**, 417 (1935); zit. nach GÄUMANN, 1949.

## Der Stoffwechsel heterotropher Flagellaten III—VIII<sup>1</sup>.

### III. Mitteilung.

#### Monocarbonsäuren als Kohlenstoffquelle.

Von

KARL REINHARDT.

(Eingegangen am 12. November 1943.)

Die Monocarbonsäuren stellen für die Ernährung *heterotropher Flagellaten* wohl die wichtigsten Verbindungen dar, denen gegenüber alle anderen, wie z. B. Alkohole, in den Hintergrund treten. Man kann diese Flagellaten daher mit Recht — wie dies wiederholt auch geschehen ist — als „Fettsäure-Organismen“ (Acetatflagellaten nach E. G. PRINGSHEIM) bezeichnen. Neben der Essigsäure ist es allerdings nur die n-Buttersäure, die jene als Kohlenstoffquelle erreicht oder in zahlreichen Fällen (bei gleicher C-Menge) sogar um 20% übertrifft, wie Tab. I zeigt. Hinsichtlich der Konzentration sei bemerkt, daß 50 bis 200 mg C je 100 cm<sup>3</sup> Nährlösung in Form von Essigsäure gleich wirken. Im folgenden ist stets auf 50 mg C/100 cm<sup>3</sup> als Essigsäure bezogen. Verwendet wurde, auch bei den übrigen Säuren, das Na-Salz. Über die Nährlösung im einzelnen vergleiche man die I. Mitteilung.

Um die aufgezeigten Ergebnisse für eine nähere Besprechung und weitere Auswertung übersichtlicher zu gestalten, sind die auf Grund der Trockengewichtsbestimmungen errechneten Ertragsfaktoren für Kohlenstoff ( $F_C$ ), bezogen auf Essigsäure = 100, in Tab. I zusammengestellt. Über die tatsächliche Verwertung der Essigsäure unterrichten die in der letzten Spalte der Tab. I aufgeführten „Acetat-Grundzahlen“, die (abgerundet) mg Trockengewicht in 250 cm<sup>3</sup> Nährlösung mit 125 mg C als Essigsäure = 50 mg C/100 bedeuten<sup>2</sup>. Auch die übrigen Säuren wurden in der Menge von 50 mg C/100 gegeben. Als gänzlich ungeeignet, daher nicht in der Tabelle aufgeführt, erwiesen sich: Ameisensäure, iso-Valeriansäure, Methyläthyllessigsäure und Trimethyllessigsäure.

<sup>1</sup> Die I. und II. Mitteilung dieser Reihe ist in Band 13 (1944) dieser Zeitschrift S. 301 und 329 erschienen. Die Mitteilungen III—V sind in Heft 5 des 13. Bandes zum Abdruck gekommen (S. 393, 419 und 433). Das ausgedruckte Heft ging jedoch durch Kriegseinwirkung verloren. Die jetzige Wiedergabe der verloren gegangenen Mitteilungen erfolgt gekürzt unter starker Anlehnung an die ausführlichen Zusammenfassungen des Autors und ist von A. RIPPEL besorgt worden.

Die Arbeiten wurden in den Jahren 1939 bis 1941 in Prag durchgeführt. Der Verfasser fiel den Nachkriegswirren zum Opfer. Die Herausgeber halten es für ihre Pflicht, die Hauptergebnisse der Arbeiten der Öffentlichkeit zugänglich zu machen.

<sup>2</sup> Daß hier häufig die Zahl 100 erscheint, ist nur Zufall und hat nichts mit den übrigen relativen Werten zu tun.

Arten	Monocarbonsäuren										Acetat-Grundzahl	
	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	n-C <sub>4</sub>	i-C <sub>4</sub>	C <sub>6</sub>	n-C <sub>6</sub>	i-C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>
<i>Chilomonaden:</i>												
<i>Chilomonas paramecium</i> ..	100	79,8	119,9	79,6	70,0	99,8	49,6	49,7	54,2	21,1	18,2	20,3
<i>Ch. conformis</i> .....	100	80,4	120,3	81,2	70,5	97,8	48,7	49,9	54,4	23,2	21,3	21,1
<i>Ch. oblonga</i> .....	100	0	110,8	0	99,1	80,9	0	0	50,7	0	22,2	31,4
<i>Ch. longata</i> .....	100	0	109,3	0	100,1	80,1	0	0	49,2	0	20,7	29,2
<i>Ch. globosa</i> .....	100	0	100,1	0	99,3	81,9	0	0	47,7	0	20,8	31,3
<i>Polyblepharidineen</i> <sup>2</sup> :												
<i>Polytomella caeca</i> .....	100	70,8	132,7	0	89,8	68,3	0	38,2	53,2	22,2	31,7	31,5
<i>P. agilis</i> .....	100	67,3	125,7	0	88,8	70,5	0	44,3	49,3	20,7	36,8	29,8
<i>P. globosa</i> .....	100	68,2	128,4	0	92,5	69,7	0	42,0	58,5	23,8	29,7	33,2
<i>Polytomeen:</i>												
<i>Polytoma obtusum</i> .....	100	0	101,3	0	0	61,5	0	0	0	0	0	0
<i>P. majus</i> .....	100	0	104,7	0	0	61,1	0	0	0	0	0	0
<i>P. Pascheri</i> .....	100	0	106,9	0	0	59,0	0	0	0	0	0	0
<i>P. caudatum</i> .....	100	0	104,0	0	0	59,8	0	0	0	0	0	0
<i>P. wella</i> .....	100	0	100,5	0	99,8	86,9	0	0	49,8	0	21,6	31,6
<i>P. angustum</i> .....	100	0	102,2	0	99,9	79,1	0	0	48,4	0	22,9	28,6
<i>P. minus</i> .....	100	0	103,2	0	98,5	82,1	0	0	52,4	0	20,4	20,9
<i>P. papillatum</i> .....	100	0	100,9	0	100,5	96,9	0	0	47,7	0	17,5	31,3
<i>P. curvatum</i> .....	100	0	101,0	49,4	0	78,5	42,8	0	50,3	0	30,2	30,2
<i>P. coniforme</i> .....	100	0	105,5	48,6	0	81,1	40,8	0	54,7	0	31,8	20,3
<i>P. dorsiventrale</i> .....	100	0	103,1	48,4	0	80,0	40,7	0	50,5	0	20,1	20,0
<i>P. ocellatum</i> .....	100	82,0	112,9	83,5	69,4	98,8	50,6	48,2	52,2	22,3	21,5	19,7
<i>P. tetraoleare</i> .....	100	74,8	116,1	81,8	73,0	100,6	50,7	50,9	48,8	20,9	21,2	21,7
<i>P. cylindraceum</i> .....	100	80,6	116,6	83,3	71,0	100,5	54,1	53,4	51,3	23,4	21,9	28,7
<i>Eugleninen:</i>												
<i>Euglena viridis</i> .....	100	0	101,2	0	0	59,4	0	0	0	0	0	0
<i>E. gracilis</i> .....	100	79,2	129,8	80,1	68,0	97,0	51,5	48,2	48,0	20,5	18,2	19,0
<i>E. grac. var. robusta</i> .....	100	79,6	119,7	80,1	72,6	99,9	52,6	49,6	55,1	21,0	23,5	21,9
<i>Astasia longa</i> .....	100	78,9	125,8	77,7	68,7	99,9	15,0	50,5	50,1	19,9	22,5	21,5
<i>A. quartana</i> .....	100	81,1	120,8	81,1	71,6	99,4	58,6	52,6	54,0	19,3	22,1	21,0
<i>A. Chattoni</i> .....	100	81,2	118,3	79,9	66,6	99,6	47,1	50,1	49,9	23,0	21,4	25,4

<sup>1</sup> C<sub>2</sub> = Essigsäure, C<sub>3</sub> = Propionsäure, n-C<sub>4</sub> = n-Buttersäure, i-C<sub>4</sub> = iso-Buttersäure, C<sub>5</sub> = Valeriansäure, n-C<sub>6</sub> = n-Capronsäure, i-C<sub>6</sub> = iso-Capronsäure, C<sub>7</sub> = Heptylsäure, C<sub>8</sub> = Octylsäure, C<sub>9</sub> = Nonylsäure, C<sub>10</sub> = Decylsäure, C<sub>12</sub> = Duodecylsäure.

Ertrag bei Essigsäure = 100 gesetzt. Über „Acetat-Grundzahl“ siehe Text.

<sup>2</sup> Vgl. Fußnote <sup>1</sup> auf S. 272.



Auf den ersten Blick scheint das Verhalten der einzelnen Flagellaten regellos zu sein. Beim näheren Vergleich können jedoch im allgemeinen 5 grundsätzlich verschiedene physiologische Gruppen erkannt werden:

1. Arten, welche nur Fettsäuren mit gerader Kohlenstoffanzahl, und zwar nur solche bis einschl. Capronsäure, verwerten können: *Polytoma obtusum*, *P. majus*, *P. Pascheri*, *P. caudatum* und *Euglena viridis*. Bei diesen Formen ist Essigsäure und n-Buttersäure eine gleich gute Kohlenstoffquelle ( $F_C = 100$ ), n-Capronsäure tritt mit  $F_C = 60$  dagegen zurück.

2. Arten, welche Fettsäuren mit gerader und ungerader Kohlenstoffanzahl assimilieren können, von letzteren jedoch nur Valeriansäure: *Chilomonas oblonga*, *Ch. longata*, *Ch. globosa*, *Polytoma uvella*, *P. angustum*, *P. minus* und *P. papillatum*. n-Buttersäure ist hier mit  $F_C = 110$  etwas besser geeignet als Essigsäure mit  $F_C = 100$ , n-Capronsäure wird weniger gut verwertet ( $F_C = 80$ ), Octylsäure ( $F_C = 50$ ), Decylsäure ( $F_C = 20$ ) und Duodecylsäure ( $F_C = 30$ ) ermöglichen geringere Vermehrung. n-Valeriansäure schließlich, die einzige auswertbare Fettsäure mit ungerader Kohlenstoffanzahl, ist mit  $F_C = 100$  ebenso gut verwertbar wie Essigsäure.

3. Arten, welche Fettsäuren mit gerader und ungerader Kohlenstoffanzahl bis Duodecylsäure ohne Ausnahme verwerten können: *Polytomella agilis*, *P. caeca* und *P. globosa*. n-Buttersäure ist mit  $F_C = 120$  der Essigsäure deutlich überlegen, alle anderen Säuren liefern mit zunehmender Kohlenstoffanzahl immer geringer werdende Erträge.

4. Arten, die Fettsäuren mit gerader Kohlenstoffanzahl und iso-Verbindungen auswerten können: *Polytoma curvatum*, *P. coniforme* und *P. dorsiventrale*. Essigsäure und n-Buttersäure sind mit  $F_C = 100$  die besten Kohlenstoffquellen, n-Capronsäure ist mit  $F_C = 80$  bereits etwas weniger gut, alle anderen Säuren liefern Erträge mit einem  $F_C$  zwischen 50 und 30.

5. Arten, welche Fettsäuren mit gerader und ungerader Kohlenstoffanzahl sowie iso-Fettsäuren verwerten können: *Chilomonas paramaecium*, *Ch. coniformis*, *Polytoma ocellatum*, *P. tetraoleare*, *P. cylindraceum*, *Euglena gracilis*, *E. gracilis* var. *robusta*, *Astasia longa*, *A. quartana* und *A. Chattoni*. n-Buttersäure stellt mit  $F_C = 120$  die beste C-Quelle dar, Essigsäure und n-Capronsäure sind mit  $F_C = 100$  gleich gut brauchbar, Propionsäure, iso-Buttersäure<sup>1</sup> und Valeriansäure mit  $F_C = 80$  bzw. 70 treten bereits etwas zurück, und die übrigen Fettsäuren liefern höchstens 50% der mit Essigsäure erzielbaren Erträge.

Betrachten wir diese 5 Gruppen näher, so sehen wir deutlich die Unterschiede im Verhalten der einzelnen Flagellaten, die zu den Gruppen 1,

<sup>1</sup> Die positiven Literaturangaben über die Verwertung von iso-Buttersäure durch *Polytomella*-Arten dürften auf die Verunreinigung des Präparates mit n-Buttersäure zurückzuführen sein.

2, 3, 4 und 5 gehören. Lediglich der Unterschied zwischen Gruppe 2 und 3 scheint gering, einmal wird nur Valeriansäure von den Säuren mit ungerader Kohlenstoffanzahl verwertet, das andere Mal sämtliche zwischen  $C_3$  und  $C_9$ . Ich trenne diese Gruppen aber absichtlich, weil, wie später gezeigt werden soll, Gruppe 2 keine Alkohole verwerten kann, während Gruppe 3 verschiedene Alkohole assimiliert.

Das Verhalten aller Flagellaten paßt mit einer Ausnahme ohne Zwang in diese Gruppierung. Lediglich *Euglena gracilis* vermag iso-Buttersäure nicht auszuwerten, obwohl alle anderen Vertreter der Gruppe 5 dazu imstande sind. Es scheint dies aber kein Grund zu sein, diesen Vertreter auszuschließen und womöglich als eigene Gruppe zu behandeln. Die obige Gliederung stellt ja nur den ersten Versuch dar, unsere Organismen auf Grund ihres experimentell sichergestellten ernährungsphysiologischen Verhaltens in ein System zu bringen. Es ist mir bekannt, daß dieser Anfang keine endgültige Lösung darstellen kann, er soll nur den ersten Schritt bilden, um in das bisher scheinbar heterogene Verhalten eine gewisse Ordnung zu bringen.

#### IV. Mitteilung.

##### Alkohole als Kohlenstoffquelle.

(Eingegangen am 24. Januar 1944.)

Eine gewisse Anzahl von Alkoholen kann vom Großteil der hier untersuchten *Flagellaten* als Kohlenstoffquelle verwertet werden. Andere Alkohole sind nur sehr beschränkt verwertbar, gewisse *Flagellaten* können Alkohole überhaupt nicht assimilieren. Um eine Übersicht über die ernährungsphysiologischen Verhältnisse zu erlangen, soll zunächst in ähnlicher Weise, wie dies bei der Besprechung der Ergebnisse mit Monocarbonsäure geschehen ist, eine tabellarische Zusammenstellung der erzielten Erträge bzw. Ertragsfaktoren ( $F_C$ ) gegeben werden (Tab. 2).

Wenn wir das Verhalten der einzelnen Arten an Hand der bei der Besprechung der Monocarbonsäuren (s. III. Mitteilung) getroffenen Gruppeneinteilung auch hier vornehmen, so können wir aus Tab. 2 folgendes ersehen:

1. *Gruppe* (Fettsäuren mit gerader Kohlenstoffanzahl werden assimiliert): Die hierher gehörigen Arten können keinen Alkohol als Kohlenstoffquelle verwerten.

2. *Gruppe* (Fettsäuren mit gerader und ungerader Kohlenstoffanzahl werden assimiliert, letztere nur in beschränktem Ausmaß): Auch die hier eingereihten Arten assimilieren keinen Alkohol.

3. *Gruppe* (Fettsäuren mit gerader und ungerader Kohlenstoffanzahl werden ohne Ausnahme assimiliert): Alkohole mit gerader Kohlenstoffanzahl werden bis  $C_6$  verwertet, solche mit ungerader Anzahl nur in Form von  $C_3$ .

Tabelle 2. Ertragsfaktoren ( $F_C$ ) der Alkohole.

Arten	Alkohole									
	$C_2$	$C_3$	$n-C_4$	$i-C_4$	$C_5$	$C_6$	$C_8$	$C_{10}$		
<i>Chilomonaden:</i>										
<i>Chilomonas paramacium</i> .....	100,2	79,5	120,6	80,8	70,9	101,0	48,6	32,4		
<i>Ch. coniformis</i> .....	100,1	80,2	119,7	79,9	70,9	99,5	50,5	29,5		
<i>Ch. oblonga</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Ch. longata</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Ch. globosa</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Polyblepharidineen:</i>										
<i>Polytomella caeca</i> .....	126,8	58,5	124,0	0	0	100,7	0	0		
<i>P. agilis</i> .....	123,5	62,5	121,5	0	0	98,5	0	0		
<i>P. globosa</i> .....	121,3	60,6	120,3	0	0	105,8	0	0		
<i>Polytomeen:</i>										
<i>Polytoma obtusum</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>P. mayus</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>P. Pascheri</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>P. caudatum</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>P. uvella</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>P. angustum</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>P. minus</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>P. papillatum</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>P. curvatum</i> .....	101,0	0	99,6	49,9	0	81,7	52,6	0		
<i>P. coniforme</i> .....	99,2	0	99,4	51,4	0	82,2	50,2	0		
<i>P. dorsiventrale</i> .....	101,1	0	105,1	49,2	0	77,4	48,1	0		
<i>P. ocellatum</i> .....	99,8	81,7	113,4	78,2	57,4	98,9	50,3	34,6		
<i>P. tetraoleare</i> .....	99,3	80,1	111,2	81,7	61,7	99,1	54,3	42,5		
<i>P. cylindraceum</i> .....	99,0	78,5	121,6	80,9	65,2	82,2	50,0	39,8		
<i>Eugleninen:</i>										
<i>Euglena viridis</i> .....	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>E. gracilis</i> .....	102,7	79,2	122,8	82,8	62,8	99,9	48,0	43,3		
<i>E. grac.</i> var. <i>robusta</i> .....	99,6	80,1	125,3	82,1	62,0	97,5	51,8	48,8		
<i>Astasia longa</i> .....	100,4	78,4	118,3	71,9	60,0	100,4	48,6	41,8		
<i>A. quartana</i> .....	98,0	81,4	116,0	78,3	57,5	99,7	53,7	39,5		
<i>A. Chattoni</i> .....	100,5	75,1	122,9	82,5	82,7	104,0	51,1	39,8		

<sup>1</sup>  $C_2$  = Äthylalkohol,  $C_3$  = n-Propylalkohol,  $n-C_4$  = n-Butylalkohol,  $i-C_4$  = iso-Butylalkohol,  $C_5$  = n-Amylalkohol,  $C_6$  = n-Hexylalkohol,  $C_8$  = n-Octylalkohol,  $C_{10}$  = n-Decylalkohol. Ertrag bei Essigsäure = 100 gesetzt.

4. *Gruppe* (Fettsäuren mit gerader Kohlenstoffanzahl und iso-Fettsäuren werden assimiliert): Alkohole mit gerader Kohlenstoffanzahl werden bis  $C_8$  verwertet, ebenso iso-Alkohole.

5. *Gruppe* (Fettsäuren mit gerader und ungerader Kohlenstoffanzahl sowie iso-Fettsäuren werden assimiliert): Sämtliche einwertigen primären Alkohole werden verwertet und zwar solche mit gerader Kohlenstoffanzahl bis  $C_{10}$ , mit ungerader bis  $C_5$ , desgleichen auch iso-Alkohole.

Sekundäre Alkohole werden in keinem Fall assimiliert, gleichgültig ob es sich um geradzahlige oder ungeradzahlige Kohlenstoffketten handelt. Primäre Alkohole mit ungerader Kohlenstoffanzahl werden nur bis  $C_5$  verwertet. Höhere iso-Alkohole sind gleichfalls zur Züchtung ungeeignet, desgleichen mehrwertige Alkohole. Die als ungeeignet erkannten, nicht in der Tabelle aufgeführten Alkohole sind:

Methanol, Propanol-2, Butanol-2, Methylpropanol-2, 2-Methylbutanol-1, 2-Methylbutanol-2, 2-Methylbutanol-4, Heptanol-1, Nonanol-1; Äthylenglykol, Glycerin, Erythrit, Arabit, Xylit, Mannit, Sorbit, Dulcit.

#### V. Mitteilung.

### Weitere C-Quellen und Zusammenfassung der Kohlenstoffernährung.

(Eingegangen am 3. April 1944.)

Die Ergebnisse sind in der üblichen Weise in Tab. 3 zusammengestellt. Keinerlei Wachstum bei keiner der untersuchten Arten ergab sich mit folgendenenden, nicht in die Tabelle aufgenommenen C-Quellen:

Formaldehyd, Acetaldehyd, Aceton.

Glykolsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Citronensäure, Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Pimelinsäure, Korksäure, Maleinsäure, Fumarsäure. Positive Ergebnisse mit Bernsteinsäure erwiesen sich als durch Verunreinigung des Präparates mit Essigsäure oder Acetat bedingt.

Kohlenhydrate: Arabinose, Xylose, Dextrose, Mannose, Galaktose, Lävulose, Sorbose, Maltose, Cellobiose, Trehalose, Lactose, Melibiose, Saccharose, Raffinose, Dextrin, Inulin, Stärke.

Tabelle 3. Ertragsfaktoren ( $F_C$ ) für einige weitere Kohlenstoffquellen.

Arten	Glyzerin- aldehyd	Dioxy- aceton	Milchsäure	Brenz- traubensäure
<i>Chilomonaden:</i>				
<i>Chilomonas paramaecium</i> .....	50,4	96,1	103,7	98,6
<i>Ch. coniformis</i> .....	48,0	95,6	100,0	98,9
<i>Ch. oblonga</i> .....	0	0	0	0
<i>Ch. longata</i> .....	0	0	0	0
<i>Ch. globosa</i> .....	0	0	0	0
<i>Polyblepharidineen:</i>				
<i>Polytomella caeca</i> .....	0	98,0	0	0
<i>P. agilis</i> .....	0	102,0	0	0
<i>P. globosa</i> .....	0	95,8	0	0



Tabelle 3. (Fortsetzung.)

Arten	Glyzerin- aldehyd	Dioxy- aceton	Milchsäure	Brenz- traubensäure
<i>Polytomeen:</i>				
<i>Polytoma obtusum</i> .....	0	0	0	0
<i>P. majus</i> .....	0	0	0	0
<i>P. Pascheri</i> .....	0	0	0	0
<i>P. uvella</i> .....	0	0	0	0
<i>P. angustum</i> .....	0	0	0	0
<i>P. minus</i> .....	0	0	0	0
<i>P. papillatum</i> .....	0	0	0	0
<i>P. curvatum</i> .....	0	101,9	0	0
<i>P. coniforme</i> .....	0	98,4	0	0
<i>P. dorsiventrale</i> .....	0	97,1	0	0
<i>P. ocellatum</i> .....	51,9	99,1	98,7	97,5
<i>P. tetraoleare</i> .....	52,5	99,1	100,0	99,6
<i>P. cylindraceum</i> .....	49,1	98,2	97,7	98,8
<i>Eugleninen:</i>				
<i>Euglena viridis</i> .....	0	0	0	0
<i>E. gracilis</i> .....	94,0	98,9	97,7	99,8
<i>E. grac. var. robusta</i> .....	57,3	104,0	95,5	97,5
<i>Astasia longa</i> .....	48,6	99,7	99,0	95,8
<i>A. quartana</i> .....	53,2	96,5	100,5	99,3
<i>A. Chattoni</i> .....	49,5	101,8	97,4	99,8

Auf Ertrag bei Essigsäure = 100 bezogen.

Die in den vorangehenden Mitteilungen vorgenommene Gruppierung der untersuchten *heterotropen Flagellaten* ist in Tab. 4 noch einmal qualitativ hinsichtlich der Verwertbarkeit der einzelnen Stoffe wiedergegeben. Wie man sieht, führt sie von der anspruchsvollsten *Obtusum*-Gruppe, die nur Monocarbonsäuren mit gerader C-Anzahl bis zu C<sub>6</sub> verwertet (ohne die Iso-Form) bis zur anspruchslosesten *Ocellatum*-Gruppe. Alle weiteren Einzelheiten können aus den Tab. 1—3 entnommen werden.

Tabelle 4. Ernährungsphysiologische Gruppen heterotropher Flagellaten.

Gruppen	Fettsäuren mit				Alkohole mit				Milchsäure	Brenz- traubensäure	Glycerin- aldehyd	Dioxyaceton
	gerader C-Anzahl	unge- rader	iso- Bindung		gerader C-Anzahl	unge- rader	iso- Bindung					
<i>Obtusum</i> -Gruppe ..	+	—	—		—	—	—		—	—	—	—
<i>Uvella</i> -Gruppe ...	+	+	—		—	—	—		—	—	—	—
<i>Agilis</i> -Gruppe ....	+	+	—		+	+	—		—	—	—	+
<i>Curvatum</i> -Gruppe .	+	—	+		+	—	+		—	—	—	—
<i>Ocellatum</i> -Gruppe .	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+

I. *Obtusum*-Gruppe. Leitform: *Polytoma obtusum*. Dazu gehören: *Polytoma obtusum*, *P. majus*, *P. Pascheri*, *P. caudatum*, *Euglena viridis*.

II. *Uvella*-Gruppe. Leitform: *Polytoma uvella*. Dazu gehören: *Polytoma uvella*, *P. angustum*, *P. minus*, *P. papillatum*, *Chilomonas oblonga*, *Ch. longata*, *Ch. globosa*.

III. *Agilis*-Gruppe. Leitform: *Polytomella agilis*. Dazu gehören: die drei *Polyblepharidineen* *Polytomella agilis*, *P. caeca*, *P. globosa*.

IV. *Curvatum*-Gruppe. Leitform: *Polytoma curvatum*. Dazu gehören: *Polytoma curvatum*, *P. coniforme*, *P. dorsiventrale*.

V. *Ocellatum*-Gruppe. Leitform: *Polytoma ocellatum*. Dazu gehören: *P. ocellatum*, *P. tetraoleare*, *P. cylindraceum*, *Euglena gracilis*, *E. gracilis* var. *robusta*, *Astasia longa*, *A. quartana*, *A. Chattoni*.

## VI. Mitteilung.

### Das ernährungsphysiologische Verhalten verschiedener Stämme der gleichen Art.

(Eingegangen am 26. Mai 1944.)

Außer den jeweiligen Normalstämmen, deren Verhalten in den vorangehenden Mitteilungen geschildert ist, wurden von einigen Arten noch weitere Stämme aus der Natur isoliert, an denen die Eignung einer Reihe von Kohlenstoffquellen geprüft wurde. Es handelte sich um *Chilomonas oblonga* (3 weitere Stämme), *Polytoma caeca* (3), *Polytoma uvella* (5), *Polytoma ocellatum* (4) und *Astasia longa* (3).

Es ergab sich dabei, daß innerhalb der gleichen Art in keinem Fall Verschiedenheiten ernährungsphysiologischer Art auftreten. Meine Befunde stimmen mit den Ergebnissen von PROVASOLI überein, anderslautende Angaben von PRINGSHEIM sind wohl nur so zu deuten, daß zur Beimpfung seiner Versuche Stämme verschiedener Artzugehörigkeit verwendet wurden, wobei die im Normalzustand vorhandenen, oft nur geringen morphologischen Verschiedenheiten durch leichte Degeneration nicht mehr feststellbar waren. PRINGSHEIM mußte so zur Überzeugung gelangen, mit Stämmen der gleichen Art zu arbeiten. Wie bereits in einer früheren Mitteilung (ONDRATSCHEK, 1941d) ausführlich gezeigt werden konnte, sind *Chilomonas oblonga* und *Ch. paramaecium* nur im Normalzustand zu unterscheiden, auch geringfügige Degeneration verwischt die morphologischen Unterschiede, so daß eine Trennung der beiden Arten nicht mehr vorgenommen werden kann. Etwas Ähnliches gilt auch für *Polytoma ocellatum* und *P. obtusum*. Es kann daher mit Recht vermutet werden, daß die in den Versuchen von PRINGSHEIM vom Normalstamm abweichenden Klone den eben genannten zweiten Arten angehören, wofür schließlich auch das ernährungsphysiologische Verhalten sprechen würde.

Neben *Chilomonas oblonga*, *Polytoma ocellatum* und *Polytoma uvella* wurden hier auch *Polytomella caeca* und *Astasia longa* untersucht. Auch für diese beiden Arten gilt das eben Ausgeführte. Es steht somit fest,

daß einstweilen für keine Flagellaten-Art das Vorhandensein morphologisch gleicher, jedoch physiologisch verschiedener Stämme nachgewiesen ist. Die Möglichkeit soll damit jedoch nicht angezweifelt werden.

#### VII. Mitteilung.

### Experimentelle Untersuchungen über die Stickstoffernährung.

(Eingegangen am 26. Mai 1944.)

Für alle untersuchten Arten erwiesen sich als gute Stickstoffquelle: Glykokoll, Alanin, Serin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Ornithin, Valin, Lysin, Leucin, Isoleucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin. Verhältnismäßig schwache Vermehrung ermöglichten Histidin, Arginin, Phenylalanin und Tryptophan. Gänzlich ungeeignet waren Betain, Sarkosin, Prolin und Oxyprolin. Von Peptiden waren Glycyl-Glycin und Glycyl-Leucin gut geeignet, etwas weniger Alanyl-Glycin und Leucyl-Glycyl-Glycin. Ungeeignet waren Methylamin, Äthylamin und Propylamin, ferner Kreatin und Kreatinin. Auch Aneurin vermögen *heterotrophe Flagellaten* nicht als Stickstoffquelle zu verwerten, obwohl es sich um einen für sie lebenswichtigen Wirkstoff handelt.

Zusammengefaßt kann festgestellt werden, daß die Eignung einer organischen Verbindung als Stickstoffquelle für *heterotrophe Flagellaten* nicht von ihrem strukturellen Gesamtaufbau abhängt, sondern nur von der Art des Stickstoffeinbaus. Das Vorhandensein einer leicht abspaltbaren Aminogruppe ist entscheidend, belanglos ist jedoch die übrige Konfiguration des Grundmoleküls. Wichtig ist ferner, daß in der Aminogruppe keine Substitution stattgefunden hat. Irgendwelche Parallelen in der Auswertbarkeit von Mono- oder Dicarbonsäuren und den entsprechenden Aminosäuren sind nicht gegeben.

In einigen Versuchen wurde ferner festgestellt, daß keine der untersuchten Aminosäuren imstande ist, neben dem N- auch den C-Bedarf der Flagellaten zu bestreiten. In keinem Fall ist es möglich, mit einer Aminosäure allein Vermehrung zu erzielen, eine gesonderte Kohlenstoffquelle ist stets unentbehrlich.

Zur Methodik sei noch bemerkt, daß die Nährlösungen für die besprochenen Versuche wegen der mitunter geringen Hitzeresistenz der Aminosäuren nicht im Autoklaven sterilisiert werden konnten, sondern mittels Filtration durch eine „Filtrationsglocke für Bakterienfiltrationen“ (SCHOTT Nr. 4116) entkeimt wurden.

#### VIII. Mitteilung.

### Einige biochemische Feststellungen.

(Eingegangen am 26. Mai 1944.)

#### 1. Acetatverbrauch und Trockensubstanzbildung.

Der zeitliche Verlauf der Trockensubstanzbildung (jeweils mg Kohlenstoff) erfolgte bei *Polytoma agilis* folgendermaßen (Tab. 5):

Tabelle 5. Trockensubstanzbildung und Acetatverbrauch bei *Polytoma agilis*.

	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Trockensubstanz mg C .....	0,46	1,74	4,07	6,15	7,63	8,14	8,52	8,60	8,60	8,64	8,60	8,64
Acetatverbrauch mg C .....	2,5	6,6	11,6	15,4	17,8	19,8	20,4	21,2	21,9	22,6	23,2	23,6

Nach 12 Tagen waren also Trockensubstanzbildung und Acetatverbrauch beendet; nur der Acetatverbrauch stieg noch ganz langsam an. Am 12. Tage war fast der halbe Gewichtsanteil an C des verbrauchten Acetats zum Aufbau der Trockensubstanz verwendet.

### 2. Der Kohlenstoffgehalt der Trockensubstanz.

Für die vergleichenden Versuche wurde stets der Kohlenstoffgehalt als Grundlage genommen. Es wurde daher durch nasse Verbrennung der Kohlenstoffgehalt der Trockensubstanz bei einigen der untersuchten Formen bestimmt, wobei sich ergab: *Chilomonas paramaecium* 43,8%, *Polytomella agilis* 42,4%, *Polytoma uvella* 42,5%, *Astasia longa* 47,4%.

### 3. Untersuchung des Essigsäureabbaus.

In Nährlösung mit Essigsäure als Kohlenstoffquelle, dazu die notwendigen Mineralsalze und Wirkstoffe, wurde für *Polytoma agilis* die Bildung von Bernsteinsäure festgestellt; die Prüfung auf Fumarsäure und Äpfelsäure verlief negativ. Die Bernsteinsäure wurde als Bleisalz isoliert, ferner wurde der p-Bromphenacylester hergestellt und durch den Schmelzpunkt identifiziert. Der Abbau der Essigsäure erfolgt somit über die Bernsteinsäure.

### 4. Beeinflussung der Bernsteinsäurebildung durch verschiedene Versuchsbedingungen.

Die Menge der in 250 cm<sup>3</sup> Nährlösung gebildeten Bernsteinsäure betrug nach 6 Tagen 5,73, nach 12 Tagen 6,17 mg (jeweils Mittel aus 3 Bestimmungen). Sie ist also recht gering und zu verschiedenen Wachstumszeiten ungefähr gleich. Bei Impfung mit großer Zellmasse (am 12. Tage abzentrifugierte Kultur als Impfmateriel) ergab sich nur eine geringe Zunahme der Bernsteinsäure: 7,03 mg nach 6 tägiger, 7,80 nach 12 tägiger Kultur. Auch hier war also die Menge zu verschiedenen Wachstumszeiten annähernd gleich.

Es wurde weiter versucht, die Bernsteinsäure durch Zusatz von kohlensaurem Kalk anzureichern; dieser Zusatz konnte jedoch nicht von Anfang an erfolgen, da die Flagellaten dann nicht wuchsen. Er erfolgte deshalb (5 g je 250 cm<sup>3</sup> Nährlösung) am 5. Kulturtage. Die Ausbeute betrug (vom Zusatz an gerechnet) nach 1 Tag 8,47, nach 6 Tagen 9,47 und nach 24 Tagen 10,33 mg Bernsteinsäure. Eine wesentlich größere Anreicherung wurde erzielt, wenn der kohlensaure Kalk von vornherein gegeben,



aber mit einer großen, eigens dazu herangezuchteten Zellmasse geimpft wurde. Dabei trat keine weitere Vermehrung ein, wohl aber Abbau der Essigsäure. Es ergab sich nach 6 Tagen 22,87, nach 12 Tagen 28,37, nach 24 Tagen 31,27 mg Bernsteinsäure, jeweils für 250 cm<sup>3</sup> Nährlösung.

### 5. Versuchsweise Aufstellung einer Kohlenstoffbilanz.

Tabelle 6. Kohlenstoffbilanz bei *Polytomella agilis*.

(Zahlenangabe in mg C).

Versuchsbedingungen		Ein- gewogene Essigsäure	Restliche Essigsäure	Trocken- substanz- zunahme	Bernstein- säure	Anderweitig abgebaut oder veratmet			
CaCO <sub>3</sub>	Versuchstag								
ohne	12	50	= 30,2	+	8,5	+	1,0	+	10,3
mit*	6	50	= 35,0	+	0	+	3,6	+	11,4
	12	50	= 28,6	+	0	+	4,5	+	16,9
	24	50	= 20,2	+	0	+	5,1	+	24,7

\* und Einsaat eines dichten Zellgemisches.

Das Ergebnis findet sich in Tab. 6. Die erste Reihe zeigt den „Normalversuch“ ohne kohlen sauren Kalk, der den Zahlen der Tab. 5 entspricht. Im zweiten Versuch, mit kohlen saurem Kalk und dichter Aussaat, erfolgte keine Trockensubstanzbildung, stärkere Erzeugung von Bernsteinsäure und zunehmender Abbau der Essigsäure, wobei jedoch nicht entschieden werden kann, ob diese ganz zu Kohlensäure veratmet oder teilweise noch anders abgebaut wurde.

Auch für *Polytoma uvella*, *Chilomonas oblonga* und *Astasia longa* wurde Bernsteinsäure als Zwischenprodukt des Essigsäure-Abbaus festgestellt: der übliche Weg dieses Abbaus dürfte also bei den *heterotrophen Flagellaten* allgemein über die Bernsteinsäure verlaufen.

### Literatur<sup>1</sup>.

ARAGAO, H. DE BEAUREPAIRE: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro **2**, 1. (1910). — BARKER, A.: J. of Cell. and Comp. Physiol. **7**, 73 (1935) (a); **8**, 231 (1935) (b). — BÉLAÏ, K.: Arch. Protistenkde. **43**, 446 (1921). — BERLINER, E.: Arch. Protistenkde. **15**, 297 (1909). — BOLTE, E.: Jb. Bot. **59**, 287 (1920.) — BRAND, TH. V.: Erg. Biol. **12**, 161 (1935). — BUDER, J.: Biol. Kalender **1**, 1 (1913). — CZURDA, V.: Beih. Bot. Zbl. **51**, 711 (1933); **53**, 133 (1935) (a); **53**, 158 (1935) (b). — Conjugaten im Handbuch der Pflanzenanatomie (1937). — DAGYS, J.: C. r. Labor. Carlsberg **23**, 1 (1940). — DANGEARD, P. A.: C. r. Acad. Sci. **172**, 254 (1921). —

<sup>1</sup> Das Literaturverzeichnis bezieht sich auch auf die bereits früher erschienenen Arbeiten [I. u. II. Mitteilung: Bd. **13**, 301, 329 (1943)], von denen die I. Mitteilung eine kritische Literaturbesprechung bringt. Die nach Eingang der vorstehenden Mitteilungen (1944) erschienene Literatur ist natürlich unberücksichtigt geblieben.

- DOFLEIN, F.: Biol. Zbl. **36**, 43 (1916) (a). — Zool. Anz. **40**, 273 (1916) (b). — Zool. Jb., Abt. A, **41**, 112 (1918). — DOFLEIN, F., u. E. REICHENOW: Lehrbuch der Protozoenkunde, 5. Aufl., Jena 1929. — DUSI, H.: C. r. Soc. Biol. **103**, 1184 (1930) (a); **104**, 734 (1930) (b); **104**, 662 (1930) (c); **105**, 837 (1930) (d); **107**, 1232 (1931). — Ann. Inst. Pasteur **50**, 550, 1933. — Arch. Zool. Exp. et Gen. **78**, 133 (1936). — Arch. Protistenkde. **89**, 94 (1937). — FRANCÉ, R.: Jb. Bot. **26**, 2 (1894). — GEBAUER, H.: Beitr. Biol. Pfl. **18**, 445 (1930). — GEITLER, L.: Arch. Protistenkde. **47**, 1 (1929). — HALL, R. P.: Anat. Rev. **54**, 102 1932. — Arch. Protistenkde. **79**, 239 (1933); **82**, 45 (1934). — HALL, R. P., u. J. B. LOEFER: Protoplasma **26**, 322 (1936) (a). — Arch. Protistenkde. **87**, 123 (1936) (b). — HANSGIRG, A.: Sitzungsber. Böhm. Ges. Wiss., Math.-Naturw. Kl. I, 1 (1890). — HARTELIUS, V.: Biochem. Z. **261**, 89 (1933) (a). — C. r. Labor. Carlsberg **22**, 1 (1933) (b); **22**, 211, (1938); — **22**, 387 (1939) (a); **22**, 323, (1939) (b). — HARTELIUS, V., u. N. NIELSEN: C. r. Labor. Carlsberg **22**, 281 (1938). — HARTELIUS, V., u. SVERRE HJORT-HANSEN: C. r. Labor. Carlsberg **21**, 221 (1936). — HUTNER, S. H.: Arch. Protistenkde. **88**, 93 (1936). — JACOBSEN, H. C.: Z. Bot. **2**, 145 (1910). — JAHN, T. L.: Arch. Protistenkde. **61**, 287 (1931). — KARSTEN, G.: Flora **89**, 404 (1901). — KHAWKINE, W.: Ann. Sci. Nat. Paris, 6. sér., **19**, 1 (1885). — KORSCHIKOFF, A.: Russ. Arch. Protistenkde. **4**, 153 (1925). — Arch. Protistenkde. **74**, 249 (1931). — KÜSTER, E.: Arch. Protistenkde. **11**, 351 (1908). — LOEFER, J. B.: Biol. Bull. **66**, 1 (1934). — Arch. Protistenkde. **84**, 455 (1935) (a); **85**, 74 (1935) (b); **85**, 209 (1935) (c). — J. Exp. Zool. **79**, 167 (1938). — LWOFF, A.: C. r. Acad. Sci. **188**, 114 (1929). — C. r. Soc. Biol. **104**, 664 (1930); **107**, 1070 (1931). — Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires. Monographie de l'Inst. Pasteur. Paris 1932. — C. r. Soc. Biol. **119**, 87 (1935) (a); **119**, 974 (1935) (b). — Fermentations **2**, 419 (1936) (a). — C. r. Soc. Biol. **112**, 1041 (1936) (b). — Arch. Protistenkde. **90**, 194 (1938). — LWOFF, A., u. M. LWOFF: Ann. Inst. Pasteur **59**, 129 (1937) (a). — C. r. Acad. Sci. **204**, 1510 (1937) (b). — C. r. Soc. Biol. **126**, 644 (1937) (c). — LWOFF, A., u. H. DUSI: C. r. Soc. Biol. **102**, 567 (1929); **107**, 1068 (1931). — Ann. Inst. Pasteur **53**, 641 (1934). — C. r. Soc. Biol. **119**, 1260 (1935). — C. r. Acad. Sci. **202**, 248 (1936); **205**, 630 (1937) (a); **205**, 756 (1937) (b); **205**, 882 (1937) (c). — C. r. Soc. Biol. **127**, 53 (1938). — LWOFF, A., u. E. LEDERER: C. r. Soc. Biol. **119**, 971 (1935). — LWOFF, A., u. I. PIROVSKY: C. r. Soc. Biol. **124**, 1169 (1937). — LWOFF, A., u. L. PROVASOLI: C. r. Soc. Biol. **119**, 90 (1935); **126**, 279 (1937). — LWOFF, M.: C. r. Soc. Biol. **126**, 771 (1937). — C. r. Acad. Sci. **206**, 540 (1938). — LUNDT, A.: C. r. Labor. Carlsberg **21**, 231 (1936). — MAINX, F.: Arch. Protistenkde. **60**, 305 (1927) (a); **60**, 355 (1927) (b). — MAST, S. O., u. D. M. PACE: Rev. Anat. **54**, 101 (1932) (a). — Amer. J. of Physiol. **101**, 75 (1932) (b). — Protoplasma **20**, 326 (1934); **23**, 297 (1935). — NIELSEN, N.: Jb. Bot. **73**, 125 (1930). — C. r. Labor. Carlsberg **19**, 5 (1931). — Biochem. Z. **249**, 196 (1932). — C. r. Labor. Carlsberg **21**, 151 (1935); **21**, 185 (1936) (a); **21**, 427 (1936) (b). — diese Z. **8**, 422 (1937) (a). — Ann. Ferment. **2**, 577 (1937) (b). — C. r. Labor. Carlsberg **22**, 61 (1937) (c). — Protoplasma **30**, 130 (1938). — C. r. Labor. Carlsberg **23**, 107 (1940); **23**, 147 (1941). — NIELSEN, N., u. K. EISTRUP: C. r. Labor. Carlsberg **23**, 79 (1940). — NIELSEN, N., u. J. DAGYS: C. r. Labor. Carlsberg **22**, 447 (1940). — NIELSEN, N., u. FANG-SING-FANG: C. r. Labor. Carlsberg **22**, 141 (1937). — Planta **27**, 367 (1937). — NIELSEN, N., u. V. HARTELIUS: C. r. Labor. Carlsberg **19**, 8 (1932) (a). — Biochem. Z. **256**, 2 (1932) (b); **276**, 183 (1935). — Nature **138**, 203 (1936) (a). — C. r. Labor. Carlsberg **21**, 395 (1936) (b); **22**, 1 (1937); **22**, 249 (1938). — Biochem. Z. **296**, 171 (1938) (a). — C. r. Labor. Carlsberg **22**, 267, (1938) (b); **22**, 271 (1938). — Biochem. Z. **296**, 359 (1938) (c). — C. r. Labor. Carlsberg **22**, 375 (1939); **23**, 93 (1940); **23**, 155 (1941). — OEHLER, R.: Arch. Protistenkde. **40**, 16 (1919); **49**, 287 (1924). — OGATA, M.: Zbl. Bakteriologie. **14**, 165 (1893). — ONDRAT-

SCHEK, K.<sup>1</sup>: diese Z. **6**, 532 (1935). — *Planta* **26**, 227 (1936). — diese Z. **11**, 89 (1940) (a); **11**, 219 (1940) (b); **11**, 228 (1940) (c); **11**, 239 (1940) (d); **12**, 46 (1941) (a); **12**, 91 (1941) (b); **12**, 229 (1941) (c). — *Beih. Bot. Zbl.* **61**, Abt. A, 277 (1941) (d), — diese Z. **12**, 241 (1941) (e). — PASCHER, A.: *Ber. d. Dtsch. bot. Ges.* **34**, 440 (1916). — *Volvocales in Süßwasserflora 1927* (a). — *Arch. Protistenkde.* **58**, 577 (1927) (b). — *Beih. Bot. Zbl.* **45**, Abt. I, 290 (1929) (a). — *Jb. Bot.* **71**, 386 (1929) (b). — *Arch. Protistenkde.* **69**, 103 (1930) (a). — *Ann. de Prot.* **2**, 157 (1930) (b). — *Beih. Bot. Zbl.* **48**, Abt. I, 481 (1931). — PRINGSHEIM, E. G.: *Ber. d. Dtsch. bot. Ges.* **38**, 8 (1920). — *Beitr. allg. Bot.* **2**, 88 (1921). — *Saprophyten. Handwörterb. d. Naturwiss.* 2. Aufl., 8, 713 (1932). — *Naturwiss.* **22**, 510 (1934); **23**, 110 (1935). — *Beih. Bot. Zbl.* **55**, Abt. A, 100 (1936) (a). — *Arch. Protistenkde.* **87**, 43 (1936) (b); **88**, 150 (1937) (a). — *Planta* **26**, 621 (1937) (b); **26**, 665 (1937) (c); **27**, 61 (1937) (d). — *Nature* **139**, 195 (1937) (e). — PRINGSHEIM, E. G., u. F. MAINX: *Planta* **1**, 583 (1926). — PROVASOLI, L.: *C. r. Soc. Biol.* **126**, 280 (1937) (a); **126**, 847 (1937) (b); **127**, 51 (1938) (a); **127**, 190 (1938) (b). — *Boll. Zool. Agrar. Milano* **9**, 1 (1938) (c). — REINHARDT, K.<sup>1</sup>: diese Z. **13**, 301, 329 (1943). — ROTTIER, P. B.: *C. r. Soc. Biol.* **122**, 65 (1936) (a); **122**, 776 (1936) (b). — SCHERFFEL, A.: *Arch. Protistenkde.* **22**, 301 (1911); **48**, 187 (1924); **57**, 331 (1927). — SCHOPFER, W. H.: *Erg. Biol.* **16**, 1 (1939). — SCHULZE, B.: *Arch. Protistenkde.* **58**, 508 (1927). — SENN, G.: *Flagellata. Nat. Pflanzenfamilien*, I. Teil, Abt. A, (1900). — SINCLAIR, A. N.: *Nature* **140**, 361 (1937). — SKUJA, H.: *Acta Hort. Bot. Latvij.* **2**, 117 (1927). — STREHLOW, K.: *Z. f. Bot.* **21**, 625 (1928/29). — TERNETZ, CH.: *Jb. Bot.* **51**, 435 (1912). — VOLKONSKY, M.: *C. r. Soc. Biol.* **105**, 619 (1930) (a); **105**, 680 (1930) (b). — ZUMSTEIN, H.: *Jb. Bot.* **34**, 149 (1900).

<sup>1</sup> Die früheren Veröffentlichungen von K. REINHARDT erschienen unter dem Namen K. ONDRATSCHEK [vgl. Bemerkung am Eingang der Arbeiten in dieser Zeitschrift: **13**, 301, 329 (1943)].

## Zur Physiologie der Sulfatreduktion. (Zur Kenntnis der biologischen Sulfatreduktion. II.)\*

Von

A. BAUMANN und V. DENK.

(Eingegangen am 17. März 1944.)

### I.

Der Wunsch nach Klärung einiger physiologischer Fragen machte es erforderlich, Reinkulturen von *Sporovibrio desulfuricans* (Beij.) nov. comb. Starkey zu gewinnen, da die bereits seinerzeit von anderen Untersuchern<sup>1</sup> gewonnenen Reinkulturen bzw. Originalstämme nicht verfügbar waren. Verschiedene Fragen ergaben sich besonders im Hinblick auf die letzte experimentelle Arbeit über die biologische Sulfatreduktion des Zweitgenannten von uns (CZURDA 1940), in der der Ablauf der Reduktion — auch bei andauernder Kultur — in Nährlösungen, die vollkommen frei von  $H_2$  und organischen Stoffen sind, geschildert wird. Urheber dieses Phänomens ist ein ökologisch ungemein interessantes, binäres Organismengemisch, das aus einer Biocoenose der *Chromatium Weissei*- und der *Beggiatoa arachnoidea*-Gesellschaft des Lunzer Obersees stammt.

Ein Überblick über die in der Literatur beschriebenen Isolierungsmethoden lenkte die Wahl auf das von VAN DELDEN (1904) angewandte und von BAARS (1930) planmäßig ausgebauten Verfahren der Eliminierung der aeroben, fakultativ-anaeroben Begleitorganismen durch Zusatz von Sulfit oder Schwefelwasserstoffwasser, wodurch der vorhandene Sauerstoff gleich zu Versuchsbeginn gebunden wird. Die Anwendung dieser Methode führte im vorliegenden Falle aber keineswegs so rasch und reibungslos zum Ziel, wie angenommen werden durfte; die auftretenden Schwierigkeiten machten es vielmehr notwendig, sogar die Voraussetzungen zur Erlangung von Reinkulturen neuerlich nachzuprüfen und die darüber hinaus auftretenden Fragen von theoretischem Interesse

\* Die hier behandelten experimentellen Befunde wurden von der Erstgenannten in der Dissertation Prag 1943 (D 42) mitgeteilt. — Die Arbeit war in Band 13, Heft 5, S. 449 ff. dieser Zeitschrift gedruckt worden; das fertige Heft ging durch Kriegseinwirkung verloren. Der Bearbeiter (V. DENK) fiel den Nachkriegswirren in Prag zum Opfer. Die Herausgeber halten es für ihre Pflicht, die Ergebnisse der Arbeit der Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Aus der Originalarbeit wurden einige unwesentliche Einzelheiten fortgelassen, die vorliegende Bearbeitung wurde von A. RIPPEL besorgt.

<sup>1</sup> BAARS 1930, STARKEY 1938 (siehe dazu die ausführlichen referierenden Darstellungen von BAVENDAMM 1936, BUNKER 1936 und WEINBERG 1937).



nach Möglichkeit zu beantworten. Die aufgetretenen Schwierigkeiten veranlaßten auch, nochmals auf eine genaue Beschreibung der angewendeten Methoden der Anreicherung und Isolierung und des Verhaltens der gewonnenen Reinkulturen einzugehen; die bei diesen Untersuchungen gemachten Beobachtungen führen hinsichtlich der Physiologie der Sulfatreduzierer, die von der Chemie des Gärungsprozesses nicht eindeutig genug getrennt erscheint, zu überraschenden, wenn auch noch nicht völlig erklärbaren Ergebnissen.

Der Chemismus der Sulfatreduktion erscheint durch die Versuche von BAARS (1930) als stufenweise Dehydrierung der organischen Substanz und ebensolche gleichzeitige Hydrierung der  $H_2$ -Akzeptoren nach der WIELANDSchen bzw. KLUYVER-DONKERSchen Theorie befriedigend erklärt. Die Physiologie bzw. Ökologie dieser Organismen ist jedoch noch wenig bekannt. Die mit den verschiedenen C-Verbindungen als  $H_2$ -Donatoren und Energiequellen angestellten Bilanzversuche sichern immer wieder nur die Theorien des chemischen Verlaufs der Sulfatreduktion; allerdings haben sie für den Physiologen als Methode der Identifizierung des verwendeten Keimmaterials eine größere Bedeutung als die von BAARS auf morphologische Merkmale, sowie auf die Empfindlichkeit gegen Temperatur und Salzkonzentration allein gegründeten Artabgrenzungen.

Mit den Stämmen, deren Isolierung zu beschreiben sein wird und die in ihrer Stellung zu den verschiedensten  $H_2$ -Donatoren geprüft und danach mit den in der Literatur bekannten *Sporovibrio des.*-Stämmen verglichen worden sind, wurden im weiteren Gang der Arbeit quantitativ ausgewertete Versuche angestellt, deren Ergebnisse zur Klärung der Physiologie der sulfatreduzierenden Bakterien beitragen sollen.

## II. Allgemeines zur Methodik.

### a) Nährlösungen und ihre Bedeutung.

Orientierungsversuche ergaben, daß durch eine gegenüber der BAARSschen modifizierten Nährlösung größenordnungsmäßig dieselben Ergebnisse erzielt werden.

Diese modifizierte Nährlösung zur Anreicherung der Sulfatreduzierer und zur Weiterführung der Reinkulturen hatte folgende Zusammensetzung: Dest.  $H_2O$ ;  $K_2HPO_4$  0,05% ;  $NH_4Cl$  0,10% ;  $MgSO_4$  0,25% ; Na-Lactat 0,35% ; MOHRsches Salz 0,001%. Der pH-Wert wurde stets auf 7,1 eingestellt. Das Gesamtsulfat von 981 mg  $SO_4^{2-}/L$  entspricht 348 mg  $H_2S/L$ . Die originale BAARSSche Lösung enthält außerdem  $CaSO_4$ ; die geringe Löslichkeit dieser Verbindung macht aber die Nährlösung inhomogen, weshalb schon STARKEY es durch  $Na_2SO_4 + CaCl_2$  ersetzte, wahrscheinlich um gleichzeitig auch eine hinsichtlich der Kationen balanzierte Lösung zu erlangen. Auch eine lediglich aus  $MgSO_4$  0,2%, Na-Lactat 0,35%, MOHRsches Salz 0,001% bestehende Nährlösung ergab noch quantitativen Sulfatabbau. Na-, K-, Mg- und Ca-Sulfate wurden gleich abgebaut.

Als feste Nährböden wurden verwendet: 1. Die genannte modifizierte BAARSSche Lösung + 1,5% Agar-Agar, 2. ein Pepton-Dextrose-Nährboden nach STARKEY:

Glykose 1% ; Pepton 0,5% ;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,15% ; MOHRsches Salz 0,001% ; Agar-Agar 1,5% . Das Gesamtsulfat von 452 mg  $\text{SO}_4^{''}$ /L entspricht 158 mg  $\text{H}_2\text{S}$ /L.

Die Prüfung auf Anwesenheit von aeroben, fakultativ-anaeroben<sup>1</sup> Begleitorganismen geschah durch Ausstrich auf dem gebräuchlichen Bakterienagar: Fleischbrühe 50,00% ; Pepton 0,5% ; NaCl 0,1% .

Der Zusatz von Eisen in Form von MOHRschem Salz wurde vor dem Sterilisieren der Lösungen vorgenommen, ohne daß Mißerfolge in den Kulturen darauf zurückzuführen gewesen wären.

Die Bedeutung des  $\text{Fe}^{''}$  als reduzierendes Prinzip wurde von ELION (1925) erörtert; derselbe Autor berichtet über die Schwierigkeiten des Eisenzusatzes, die von BAARS schließlich durch Zufügen eines in der Bunsenflamme sterilisierten Kryställchens von MOHRschem Salz behoben wurden; dieser hat auch in einigen seiner Versuche den  $\text{Fe}$ -Zusatz vollkommen weggelassen, da er aus seinen Untersuchungen schließen konnte, daß das Eisen lediglich als Indikator der  $\text{H}_2\text{S}$ -Bildung dient.

Die Wirkung des Eisens auf die Sulfatreduktion als unentbehrlicher Spurenstoff konnte wegen der praktisch fast undurchführbaren Zubereitung einer absolut  $\text{Fe}$ -freien Nährlösung nicht dargetan werden.

Die Arbeiten von UTERMÖHLEN und GEORGI (1941) werfen ein neues Licht auf das Zustandekommen der Eisensulfidfällung; bei späteren Erfahrungen mit Kulturen von Sulfatreduzierern mit und ohne Ausbildung eines  $\text{FeS}$ -Fällungshofes werden diese Anschauungen zu berücksichtigen sein.

Sämtliche Versuchslösungen dieser Arbeit wurden im Hinblick auf die Sicherung der Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse mit destilliertem Wasser zubereitet; obwohl von einigen Autoren (BEIJERINCK 1895, ELION 1925, GAHL und ANDERSSON, 1928) das Ausbleiben der Sulfatreduktion mit der Verwendung von destilliertem Wasser begründet wurde, zeigten eigene Versuche, daß es gelingt, die Organismen auch in Lösungen mit destilliertem Wasser zur Vermehrung und Sulfatreduktion zu bringen.

*b) Kulturanordnung: Gefäße, Gasraum, Anreicherung der Organismen, Isolierungsverfahren, Prüfung auf Reinheit der gewonnenen Kulturen.*

Zur Anreicherung von *Sporovibrio des.* wurden Stöpselflaschen mit der Lactat-Mineralsalzlösung drei Viertel gefüllt, sterilisiert und mit einer Öse des gewünschten Keimgemisches beimpft, aufgefüllt und verschlossen. Hatte die Probe Keime von Sulfatreduzierern enthalten, trat nach 1—2 Tagen  $\text{H}_2\text{S}$ -Bildung ein, sichtbar an den kreisrunden schwarzen Flecken, die sich in dem Eisenphosphatsediment am Boden des Fläschchens abzeichneten. Nach weiteren 24 Std war der gesamte Bodenkörper in  $\text{FeS}$  umgewandelt. Von jeder Schlammprobe war eine Anzahl Fläschchen in gleicher Weise beimpft worden, in welchen nach 7 Tagen der Schwefelwasserstoff bestimmt wurde. Das Keimgemisch, das die kräftigste Gärung zeigte, wurde zur Trennung der Sulfatreduzierer von den

<sup>1</sup> Im weiteren sollen diese Organismen abgekürzt als fakultativ-anaerob bezeichnet werden.

Begleitorganismen in weitere Kultur genommen. Die Weiterführung des Keimgemisches wurde folgendermaßen vorgenommen:

Zunächst in Reagenzröhrchen, die in Anaerobengefäßen der Firma Schott u. Gen. untergebracht waren. Die Gefäße wurden zum Zwecke der Untersuchung des Einflusses der Gaszusammensetzung a) nur evakuiert (PFEIFFER-Pumpe), b) evakuiert und mit einer berechneten Menge einer alkalischen Pyrogallol-Lösung beschickt, c) nach dem Auspumpen mit 100 bis 200 mg Hg Wasserstoff, der dem Kipp entnommen wurde, gefüllt, d) mit einer aus  $\text{Na}_2\text{S}$  und  $\text{HCl}$  in den Gefäßen entwickelten berechneten Menge  $\text{H}_2\text{S}$  gefüllt.

Die Weiterführung erfolgte in Stöpselflaschen, wie es bereits für die Anreicherungskulturen beschrieben worden ist. Jedes Keimgemisch wurde wöchentlich in je drei Flaschen mit und gleichzeitig in je drei Flaschen ohne Zusatz von  $\text{H}_2\text{S}$ -Wasser (100 mg  $\text{H}_2\text{S}$  pro Liter Nährlösung) eingepflegt und der Gärverlauf in beiden Reihen quantitativ verfolgt.

Den in andauernder Kultur befindlichen Organismengemischen wurde das Impfmaterial für die fast in jeder Kulturfolge angestellten Isolierungsversuche entnommen.

Die aus diesen Versuchen gewonnenen Stämme wurden wie von anderer Seite auch hier in Glasstöpselflaschen weitergeführt; gleichzeitig wurden aber für die Stammerhaltung Röhrchen-Lösungskulturen und Stichkanalkulturen angelegt, da die Stöpselflaschen keine absolute Asepsis gewähren. Es scheint, daß eine durch Temperaturschwankungen verursachte Saugung die am Flaschenrand aufgefallenen Keime ins Innere gelangen läßt.

Zur Isolierung wurden das KOCHSche Plattengußverfahren, der Ausstrich und der Hochschichtguß benutzt. Das BURRISche Tuschröpfchenverfahren hat im vorliegenden Fall nicht zum Erfolg geführt (s. darüber S. 296), ebenso wenig die Anwendung des Röhrchen-Hochschichtgusses, da in allen Röhrchen, die geeignete Reduziererkolonien enthielten, Begleitorganismen zwischen Agarschicht und Glas auftraten.

Da die exaktesten Vereinzelungsverfahren, nämlich das BURRISche Tröpfchenverfahren und das gleichfalls versuchte Zehntelungsverfahren, nicht zur Gewinnung von Reinkulturen geführt hatten, blieb nur das Plattengußverfahren mit seinen Nachteilen übrig. Abänderungen der üblichen Handhabung werden bei den einzelnen Versuchen besprochen werden.

Der Nachweis der Reinheit der Kulturen wurde durch den kulturellen Nachweis des Fehlens von fakultativ-anaeroben Begleitorganismen und durch den mikroskopischen Nachweis des Fehlens von anders geformten Zellen als erbracht angesehen. Um das Fehlen der fakultativ-anaeroben zu erkennen, wurde ein Tropfen der Zellsuspension in Bakteriennähragar eingepflegt oder auf diesen ausgestrichen; als Kriterium galt das Ausbleiben einer Kolonieentwicklung bei mikroskopischer Untersuchung der Platten nach 7 Tagen. Es besteht allerdings noch die Möglichkeit, daß in den Anreicherungskulturen anaerobe Begleitorganismen von *Vibrio*-bzw. *Spirillum*-Form mitgezüchtet worden sein könnten, die ja einer biologischen und mikroskopischen Reinheitsprüfung nach obiger Art entgehen (siehe auch Abschnitt IIIc, S. 301).

### c) Chemische Bestimmungsverfahren<sup>1</sup>.

*Schwefelwasserstoffbestimmung:* 10 cm<sup>3</sup> der Versuchslösung wurden in der bekannten Weise in 5 cm<sup>3</sup> n/10 Jodlösung, die mit 2 cm<sup>3</sup> verd.  $\text{HCl}$  abgesäuert

<sup>1</sup> Sämtlich aus F. P. TREADWELL, Analyt. Chemie II. Leipzig 1927.



worden war, abpipettiert; das nicht durch  $\text{H}_2\text{S}$  gebundene Jod wurde mit n/10  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  zurücktitriert. Der Fehler dieser Methode beträgt  $\pm 0,6\%$ . Außerdem wurde die Bestimmung des Schwefelwasserstoffs durch Destillation im Stickstoffstrom vorgenommen; der freigemachte  $\text{H}_2\text{S}$  wurde in drei schmale Absorptionsgefäße, beschickt mit n/10 Jodlösung, eingeleitet; die Rücktitration mit n/10  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  erfolgte wie üblich (Fehler  $\pm 0,5\%$ ).

*Sulfatbestimmung:* 1. Das Sulfat wurde in der üblichen Weise mit  $\text{BaCl}_2$  gefällt und als  $\text{BaSO}_4$  ausgewogen. 2. Das Sulfat wurde außerdem nach RASCHIG als Benzidinsulfat durch Fällung mit Benzidinchlorhydrat bestimmt. Der Fehler der Methode beträgt  $\pm 0,3\%$ .

*Ammonbestimmung:* Die Versuchslösung wurde mit 30% iger NaOH-Lösung versetzt, erwärmt und das entwickelte Ammoniak mit Wasserdampf in n/10 HCl eingeleitet. Die nicht verbrauchte Salzsäure wurde mit n/10 NaOH zurücktitriert; als Indikator diente eine Mischung von Methylrot und Methylblau (nach TASHIRO).

### III. Eigene Beobachtungen.

#### a) Isolierung und Identifizierung der Stämme.

##### Das Ausgangsmaterial.

Bei Beginn der Arbeit stand das im weiteren als Keimgemisch 1 bezeichnete Organismengemisch zur Verfügung, das aus den Untersuchungen des Zweitgenannten (CZURDA<sup>1</sup> 1940) stammt; ferner wurden Kulturen eines unrein gewordenen STARKEYSchen, thermisch-mesophilen Originalstammes<sup>2</sup> übernommen, der zunächst als Keimgemisch 2 und nach der neuerlich erfolgten Isolierung als Stamm 2 bezeichnet wurde. Stämme 3 und 4 wurden aus verschiedenen Freilandschlammproben durch Beimpfen der Lactat-Mineralsalzlösung mit etwas reduziertem Schlamm angereichert (Keimgemische 3 und 4) und abgetrennt.

##### Isolierungsmaßnahmen.

Die Mühen der Trennung der Reduzierervibrionen<sup>3</sup> von den fakultativen Anaerobiern sind seit den ersten Untersuchungen (BEIJERINCK 1895, VAN DELDEN 1904, GOSLINGS 1904, RANK 1907, KUPSIS 1928, BAARS 1930) bekannt und eingehend beschrieben worden.

Hinsichtlich der Einreihung der Sulfatreduzierer in die Gattung *Vibrio* (bzw. *Microspira*) oder Gattung *Spirillum*, die bisher verschieden vorgenommen wurde, vergleiche die Ausführungen auf S. 299.

Die scheinbar unlösliche Vergesellschaftung der Sulfatreduzierer mit den Begleitorganismen, hauptsächlich Vertretern der Coligruppe, auch mit gewissen *Micrococcus*-Arten, führte seinerzeit AYERS und JOHNSON (1924) sogar zu der Annahme, daß diese *Coli*arten ebenfalls zur Sulfatreduktion befähigt wären.

Bei der Reinzüchtung von *Sporovibrio* des. ging BAARS als der letzte Bearbeiter folgendermaßen vor: Zu Beginn jeder Überimpfung wurden die Reduziererroh-

<sup>1</sup> Frühere Veröffentlichungen von V. DENK erfolgten unter diesem Namen.

<sup>2</sup> Diesen Stamm danken wir der Freundlichkeit des Herrn Prof. KLUYVER, Delft, der ihn 1938 zur Verfügung gestellt hat.

<sup>3</sup> Für die gewissenhafte Ausführung eines Teiles der Bestimmungen danken wir den Herren Ing. A. CEJNAR und B. PROKESCH.



kulturen mit 5 cm<sup>3</sup> n/10 H<sub>2</sub>S-Wasser pro 60 cm<sup>3</sup> Nährlösung versetzt. Nach seinen quantitativen Keimzahlbestimmungen an den fakultativen Anaerobiern wurden diese durch den H<sub>2</sub>S-Zusatz allmählich so zurückgedrängt, daß in der 5. oder 6. Kulturfolge keine aerob entwicklungsfähigen Keime weder mikroskopisch als Stäbchen noch als Kolonien nach Ausstrich auf aerob gehaltenen Bakterien-Nähragar-Platten nachweisbar waren.

In allen referierenden Darstellungen des Schrifttums (BAVENDAMM 1936, BUNKER 1936, WEINBERG 1937) wird die BAARSSche Methode als das endlich gefundene verläßliche Reinzuchtverfahren dargestellt. Es hat jedoch schon STARKEY 1938, der es als erster nach BAARS anzuwenden versucht hat, keinen Erfolg damit gehabt; er erwähnt allerdings nur, daß er wegen der Langwierigkeit dieser Arbeitsweise — die Sulfatreduzierer hätten sich in Kulturlösungen mit H<sub>2</sub>S-Wasserzusatz nur äußerst langsam entwickelt — zu Isolierungen aus Ausstrichen auf Pepton-Glucose-Agar übergegangen sei. Auch vor BAARS wurde die Beobachtung gemacht, daß H<sub>2</sub>S- bzw. Sulfitzusatz nicht zum Ziele führt; so konnte GOSLINGS 1904 trotz Anwendung dieser Methode überhaupt keine Reinkulturen erlangen.

Im Hinblick auf die eben erwähnten Beobachtungen von BAARS wurden von uns die Organismengemische 1, 2, 3 und 4 in gleichzeitig durchgeführten Reihen mit und ohne Zusatz von H<sub>2</sub>S-Wasser<sup>1</sup> regelmäßig alle 7 Tage überimpft und die Anwesenheit von fakultativen Anaerobiern mikroskopisch und durch Ausstrich auf Bakterien-Nähragar kontrolliert. Ein Teil der dabei gesammelten Erfahrungen muß im folgenden ausführlicher geschildert werden, weil nur so gezeigt werden kann, daß bei der Ökologie der Sulfatreduzierer noch vordringliche Probleme zu lösen sind.

Obwohl die aeroben Ausstriche in beiden Versuchsreihen durch rund 30 Kulturfolgen keine Zurückdrängung der Begleitbakterien erkennen ließen, und sich die Erfahrungen von BAARS mit H<sub>2</sub>S-Wasserzusatz für die Keimgemische 1, 2 und 3 nicht bestätigen ließen, wurden dennoch beide Versuchsreihen mit und ohne Zusatz von H<sub>2</sub>S-Wasser in der gleichen Weise ständig fortgeführt, um vielleicht bei der fortgesetzten Kontrolle die Ursachen dieses verschiedenen Verhaltens der verwendeten Biocoenosen kennenzulernen. Die eigenen Ergebnisse der fortgesetzten Anreicherungskulturen und der aus ihnen angelegten Plattengußversuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Aus Suspensionen der Anreicherungskulturen der Keimgemische 1, 2, 3 und 4 wurde in zahlreichen Plattengüssen, Hochschichtkulturen und Ausstrichen versucht, reine Kolonien zu erhalten. Die zur Vereinzelung verwendeten Keimgemische zeigten ein gutes Gärvermögen (Tab. 1a und 1b) und erwiesen sich bei der mikroskopischen Untersuchung vorwiegend aus Vibrionen zusammengesetzt, so daß die Voraussetzung für

<sup>1</sup> Der erforderliche Schwefelwasserstoff wurde aus FeS und technischer HCl entwickelt, in dest. H<sub>2</sub>O gewaschen und in einen Kolben mit sterilem dest. H<sub>2</sub>O bis zur Konstanz des H<sub>2</sub>S-Gehalts (3,200 mg/L) eingeleitet. Ständige kulturelle Kontrollen mit Bakteriennährboden erwiesen die vollkommene Sterilität des so vorbereiteten H<sub>2</sub>S-Wassers.

die erforderliche Gewinnung ausreichend isoliert liegender und reiner Reduziererkolonien wenigstens in den höheren Verdünnungsstufen hätte gegeben sein sollen.

Ohne Beziehung auf die Art der Vorkultur (mit oder ohne Zusatz von  $H_2S$ -Wasser) und ihre Dauer traten in allen angelegten Plattenguß-verdünnungsreihen auffallenderweise nur wenige Kolonien mit  $FeS$ -Fällungshöfen und diese meist nur in den ersten zwei Verdünnungsstufen auf. Die von  $FeS$ -Niederschlägen umgebenen wenigen Kolonien waren in charakteristischer Weise von einer großen Zahl von kleinen, helleren, glänzenden, linsenförmigen Kolonien umgeben, deren Größe und Zahl mit dem Abstand von den hofbildenden Kolonien so abnahm, daß das Substrat in einer Entfernung von 3—4 mm von diesen Kolonien eine Entwicklung der zweifellos auch über diesen Abstand hinaus in gleicher Dichte eingesäten Keime nicht mehr erkennen ließ<sup>1</sup>. Unter diesen kleinen, linsenförmigen,  $FeS$ -hoffreien Kolonien fanden sich kleine, ebenfalls hoflose, jedoch körnig strukturierte Kolonien mehr oder weniger stark vertreten, die deutlich erkennbar durch die  $FeS$ -fällenden Kolonien anscheinend eine ähnliche Entwicklungsförderung erfahren haben. In den hohen Verdünnungsstufen fehlten die größeren, hofbildenden Kolonien, und damit kam auch von den offenkundig zahlreich eingesäten Keimen nichts zur Entwicklung.

Da bis dahin nur die schwarz umhöften Kolonien, entsprechend den Darstellungen im Schrifttum, als solche von Sulfatreduzierern angesehen worden waren, siehe dazu S. 296, wurden zunächst nur von ihnen Abimpfungen vorgenommen. Isolierungsversuche mit Keimmaterial geeignet erscheinender, für die Capillarpipette zugänglicher Zentralkolonien führten trotz mehrfacher Wiederholung nicht zum Ziel: Der mit den Abimpfungen gleichzeitig durchgeführte aerobe Ausstrich zeigte ein üppiges Wachstum der Begleitorganismen; demnach handelte es sich bei allen abgeimpften Kolonien um Mischkolonien.

Trotz diesen Mißerfolgen wurden die Keimgemische 1, 2, 3 und 4, wie schon erwähnt, regelmäßig in Fläschchen fortgeführt.

Die  $H_2S$ -Bildung und Ergebnisse der Reinheitsprüfung sind in den Tab. 1a und b zusammengefaßt; hier ist auch der Weg, der zur schließlichen Isolierung der Stämme 2, 3 und 4 führte, wiedergegeben.

Genauere Beobachtungen der Begleitorganismen zeigten die verblüffende Tatsache, daß auch die in Plattengußschichten isoliert liegenden, einheitlich erscheinenden Kolonien der Begleitorganismen (Stäbchen) des Keimgemisches 3, sowohl bei Fortzüchtung auf Peptonagar als auch in Fläschchen mit Lactat-Mineralsalzlösung weiter überimpft, immer wieder imstande waren, das gesamte MOHRsche Salz dieser

<sup>1</sup> Die beiden der Arbeit beigelegten Abbildungen sowie deren Klischees gingen ebenfalls verloren.

Tabelle 1a. Gärverlauf der Keimgemische 1 und 2 in einer Reihe von Kulturfolgen bis zur Isolierung von Stamm 2.

Jede Kulturfolge 7 und 14 Tage. Das Gesamtsulfat von 981 mg  $\text{SO}''_4/\text{L}$  entspricht 348 mg  $\text{H}_2\text{S}/\text{L}$ .

Kultur- folgen	Keimgemisch 1				Keimgemisch 2			
	7 Tage		14 Tage		7 Tage		14 Tage	
	ohne $\text{H}_2\text{S}$	fak.- anaerob*	mit $\text{H}_2\text{S}$	fak.- anaerob*	ohne $\text{H}_2\text{S}$	fak.- anaerob*	mit $\text{H}_2\text{S}$	fak.- anaerob*
1	272	+	290	+	331	+	309	+
2	277	+	119	+	290	+	220	+
3	287	+	103	+	261	+	100	+
4	285	+	100	+	263	+	216	+
5	345	+	156	+	306	+	30	+
6	309	+	107	+	272	+	126	+
7	283	+	220	+	292	+	110	+
28	290	+	226	+	284	+	229	+
29	295	+	263	+	312	—	274	—

Bis heute eine Isolierung unmöglich.

Stamm 2 isoliert aus K 29; in dieser Kulturfolge sowohl das Material mit als auch das ohne  $\text{H}_2\text{S}$ -Zusatz rein.

\* Stäbchen

Tabelle 1b. Gärverlauf der Keimgemische 3 und 4 in einer Reihe von Kulturfolgen bis zur Isolierung der Stämme 3 und 4.

Jede Kulturfolge 7 und 14 Tage. Das Gesamtsulfat von 981 mg  $\text{SO}''_4/\text{L}$  entspricht 348 mg  $\text{H}_2\text{S}/\text{L}$ .

Kultur- folgen	Keimgemisch 3				Keimgemisch 4			
	7 Tage		14 Tage		7 Tage		14 Tage	
	ohne $\text{H}_2\text{S}$	fak.- anaerob*	mit $\text{H}_2\text{S}$	fak.- anaerob*	ohne $\text{H}_2\text{S}$	fak.- anaerob*	mit $\text{H}_2\text{S}$	fak.- anaerob*
1	151	+	279	+	40	+	86	+
2	324	+	153	+	42	+	35	+
3	292	+	133	+	207	+	225	+
4	287	+	260	+	136	+	66	+
5	290	+	165	+	49	+	211	—
6	277	+	161	+	68	+	228	—
7	324	+	30	+	249	+	260	—
15	292	+	127	+	308	—	320	—

Durch das Plattengußverfahren isoliert aus K 15; Material ohne und mit  $\text{H}_2\text{S}$ -Zusatz unrein.

Isoliert aus K 6; in dieser Kulturfolge war nur das Material mit  $\text{H}_2\text{S}$ -Zusatz rein.

\* Stäbchen

Kulturlösung als  $\text{FeS}$  zu fällen, daß also auch diese Mischkolonien waren. Dies veranlaßte eine eingehendere Prüfung der isolierten Stämme der Begleitbakterien, die darin bestand, daß von solchen Kolonien gleichzeitig mit dem Anlegen von Stöpselflaschenkulturen fortlaufend auch in



aerob gehaltene Kölbchen mit der gleichen Lösung geimpft wurde. Noch nach fünfmaliger Überimpfung in den aerob gehaltenen Kölbchen war das so fortgeführte Keimmaterial instande, das in diesen Kölbchen am Boden befindliche Eisen als Eisensulfid zu fällen. Darüber hinaus ergab das nach fünf solcher Kulturfolgen rücküberimpfte Keimmaterial in den Stöpselflaschen, gefüllt mit Lactat-Mineralsalzlösung, nach 7 tägiger Kulturdauer eine Schwefelwasserstoffbildung von 280 mg  $\text{H}_2\text{S}$ /L. Dieses Ergebnis konnte bei mehrfacher Wiederholung des Versuchs immer im selben Ausmaß erzielt werden.

Da sich aber durch wiederholten Plattenguß die fakultativ-anaeroben Organismen doch bald rein gewinnen ließen, und Versuche analog den vorher beschriebenen, jedoch mit Reinkulturen der Begleitorganismen beimpft, in keinem Falle Sulfatreduktion erkennen ließen, ist erwiesen, daß es sich bei den anfangs verwendeten Kolonien nicht um eine neue Art von Sulfatreduzierern, sondern um Mischkolonien von reduzierenden und nichtreduzierenden Organismen gehandelt hat. Immerhin bleibt die Tatsache bemerkenswert, daß sich Sulfatreduzierer nach fünf wenigstens äußerlich aerob gehaltenen Kulturfolgen in Vergesellschaftung mit anderen vermehrungs- und gärkräftig erhielten.

Zur Erläuterung der Tab. 1a und b wird über das Verhalten der einzelnen Keimgemische noch folgendes hinzugefügt:

*Keimgemisch 1.* Das binäre Keimgemisch der *Chromatium-Weißei*-Gesellschaft ließ sich weder durch die bis heute durchlaufenen 55 Passagen mit oder ohne Zusatz von  $\text{H}_2\text{S}$ -Wasser trennen, noch durch irgendeine der verschiedenen, für die anaerobe Unterbringung der Platten oder Hochschichtröhrchen getroffenen Einrichtungen (siehe Methodik, S. 286). Diese Maßnahmen, die gleich zu Versuchsbeginn vollkommen  $\text{O}_2$ -freie Verhältnisse gewährleisten sollten, außerdem der Sulfit- oder  $\text{H}_2\text{S}$ -Wasserzusatz zu Nährlösungen und Nährböden vor dem Beimpfen, führten nicht zum Ziel. Die schon vom Zweitgenannten (CZURDA 1940) beobachtete Ergebnislosigkeit früherer ähnlicher Versuche weist auf besondere Eigenschaften des aeroben Begleitorganismus dieses Keimgemisches hin.

Es wurden bei wiederholter Anwendung eines Agar-Nährbodens mit bloßen Mineralsalzzusätzen im Plattengußverfahren immer nur wieder Kolonien mit weitreichender  $\text{FeS}$ -Fällungszone beobachtet, die manchmal, wie es auch photographische Aufnahmen in den Protokollen zeigen, in den fünf Verdünnungsstufen mit erwartungsgemäßer Häufigkeit verteilt waren. Anders beschaffene Kolonien sind nicht zur Entwicklung gelangt. Diese einheitlich aussehenden Kolonien haben sich aber durchweg als Mischkolonien von Reduzierern und Aerobiern (auch Fluorescenten) erwiesen, so daß alle Isolierungsversuche erfolglos geblieben waren.



*Keimgemisch 2.* Das im Laufe der etwa 6 Jahre langen Fortzucht durch aerobe Stäbchen verunreinigte Keimmateriel des STARKEYSchen thermisch-mesophilen *Sporovibrio des.*-Stammes, das in der oben erwähnten Weise gleichzeitig mit und ohne Zusatz von  $H_2S$ -Wasser durch ständig wiederholte Abimpfungen fortgeführt worden war, wurde zu Plattengüssen mit dem Ziel der neuerlichen Isolierung verwendet. Bei allen Abimpfungen hatte es sich jedoch bis zur 29. Kulturfolge um durch Stäbchen verunreinigte Kolonien gehandelt; in dieser Kulturfolge zeigte der aerobe Kontrollausstrich ohne erkennbare Übergänge in der Keimdichte der aeroben Begleitbakterien gegenüber der vorhergehenden Prüfung völlige Keimfreiheit. Das Material wurde nochmals in Lösungen überimpft und beide Reihen, die mit und ohne Zusatz von  $H_2S$ -Wasser, lieferten neuerlich von aeroben Stäbchen vollkommen freigebliebene Kontrollplatten.

Um die Gewähr für eine Reinkultur im bakteriologischen Sinne zu besitzen, wurde von diesem offenbar reinen Material ein Plattenguß mit Lactat-Mineralsalz-Nähragar zwecks kontrollierter Vereinzelung der Keime durchgeführt, da die Möglichkeit der Verunreinigung durch anaerobe Organismen ebenfalls in Betracht gezogen werden mußte; die Platten wurden in SCHOTTschen Anaerobengefäßen untergebracht, die nach dem Evakuieren mit alkalischer Pyrogallollösung beschickt worden sind. Die mikroskopische Untersuchung der Platten nach 5tägiger Kulturdauer zeigte schwarzumhöfte Kolonien, in deren Umgebung sich eine Anzahl kleiner, glänzender, hellbrauner Kolonien befand. Andere Kolonieformen fehlten. Eine mit großer Vorsicht, keine der benachbarten Kolonien zu berühren, ausgeführte Abimpfung für Hängetrophenpräparate zeigte, daß diese hellbraunen, linsenförmigen Kolonien ebenfalls nur aus Vibrionen und vereinzelt Spirillen zusammengesetzt waren.

Die von beiden Kolonieformen, nämlich der einen zentralen, eine fördernde Wirkung zeigenden,  $FeS$ -fällenden, und der anderen, geförderten  $FeS$ -freien, gemachten Isolierungen erwiesen sich als frei von Aerobiern, und das in Stöpselflaschen eingimpfte Material beider Koloniearten zeigte ein sofort einsetzendes gutes Gärvermögen.

Die Tatsache, daß hier morphologisch gleichaussehende Zellen Kolonien ausbilden, von denen die einen in einer merkwürdigen Weise von den anderen abhängig zu sein scheinen, soll bei der Isolierung von Stamm 3 näher erörtert werden.

Stamm 2 wird in ständiger Reinkultur gehalten.

*Keimgemisch 3.* Mit diesem Keimgemisch wurden die Untersuchungen über den Einfluß der Vorkultur, des Nährbodens und der Gaszusammensetzung im Anaerobengefaß auf das Verhalten der Begleitorganismen und den Plattenbewuchs besonders eingehend vorgenommen. Die Ergebnisse einer solchen Versuchsgruppe sollen als Beispiel für die anderen

analog angelegten dienen, die mit Keimmateriel verschiedener Kulturfolgen durchgeföhrt wurden, um einen Einblick in die Konstanz der einzelnen Erscheinungen zu gewinnen. Die Versuchsreihe umfaßt folgende Bedingungen:

## Anordnung.

Nährboden	Atmosphäre	Impfweise
I. Lactat-Mineralsalz-Agar .	Gefäß evakuiert	Plattenguß 5. Verd.-St.
II. „ „ „ .	Gefäß evakuiert	„ 5. „ „
III. STARKEYScher Agar . . . .	+ H <sub>2</sub> + alk. Pyrogallol Gefäß evakuiert	„ 5. „ „
IV. „ „ . . . .	+ H <sub>2</sub> + alk. Pyrogallol Gefäß evakuiert	Ausstrich
V. Bakterienagar aerob . . . .	+ H <sub>2</sub> + alk. Pyrogallol	„
VI. „ anaerob . . .		„

Eine dieser Versuchsreihen wurde mit dem unter H<sub>2</sub>S vorkultivierten Material d. St. 3, K<sub>15</sub>, eine zweite mit einem ohne H<sub>2</sub>S vorkultivierten Material d. St. 3, K<sub>15</sub> beimpft.

*Plattenbewuchs nach Vorkultivierung mit H<sub>2</sub>S* zeigte folgende Einzelheiten:

I. Die in den Platten auftretenden schwarzumhöften Kolonien waren von kleinen hellbraunen Kolonien umgeben, die schon von früheren Versuchen bekannt waren, die jedoch damals, da ja mit unreinem Material gearbeitet worden war, ausschließlich für Kolonien der Begleitorganismen (Stäbchen) angesehen wurden; erst als auch, bzw. nur, Vibrionen in solchen Kolonien angetroffen wurden, war erkannt, daß es sich bei den kleinen Kolonien nur teilweise um Fremd- oder Mischkolonien von Stäbchen und Vibrionen gehandelt hatte. Nochmaliger Plattenguß mit Keimen einer solchen schwarzumhöften Kolonie führte jedoch nicht zur Koloniebildung. Die Gründe hierfür werden später erörtert.

II. Der gleiche Bewuchs; die schwarz umhöften Kolonien von zahlreichen kleinen, hoflosen Kolonien umgeben. Die in der ganzen Platte offenbar gleichmäßig eingesäten Keime der mikroskopisch im Aussaatmaterial vorherrschend angetroffenen Vibrionen konnten sich nur in der Umgebung der erstentwickelten, schwarzumhöften Kolonien vermehren.

III. und IV. Der gleiche Bewuchs von schwarzumhöften, fördernden Kolonien, in deren nächster Umgebung zahlreiche hellbraune, kleine, nur hier zur Entwicklung gelangte Kolonien aufgekommen waren.

V. und VI. Der aerobe und anaerobe Kontrollplattenguß zeigte eine verhältnismäßig schwache Entwicklung fakultativ-anaerober Keime (Stäbchen) (100 bis 200 Kolonien in Platte I). Das für die Versuchsreihe herangezogene Keimgemisch war somit in der Vorkultur noch nicht von den fakultativen Anaerobiern befreit.

*Plattenbewuchs ohne Vorkultivierung mit H<sub>2</sub>S* zeigte folgende Einzelheiten:

I. Während die Abimpfungen der ersten Reihe mehrfach wegen Ausbleiben der Vermehrung ohne Erfolg blieben, konnten aus dem im ganzen gleichartigen Bewuchs der zweiten Versuchsreihe sowohl von den zentral gelegenen, schwarzumhöften,

fördernden, als auch von den hoflosen, in der Nähe der erstgenannten geförderten zahlreichen kleinen Kolonien Abimpfungen vorgenommen werden.

II. Kolonien dieser Platten gleichen Verhaltens führten wie im Versuch I zu Aerobier-freien Reduziererkulturen.

III. und IV. Plattenguß und Ausstrich mit STARKEYSchem Agar brachten die eingesäten Keime der Begleitorganismen zu üppiger Entwicklung.

V. und VI. Auf Bakterienagar mäßiges Wachstum von Begleitorganismen.

Unter Verzicht auf eine weitere Beschreibung der rund 150 Abimpfungen sei zusammenfassend gesagt, daß die Reinzüchtung von Stamm 3 nach einem Wechsel von Plattengußverfahren, Hochschicht- und Stichkanalkulturen schließlich ohne erkennbare Beziehung zu irgendwelchen bestimmten Maßnahmen aus der 15. ohne  $H_2S$  gezogenen Kulturfolge gelang. Stamm 3 wird in ständiger Reinkultur weitergeführt.

*Keimgemisch 4.* Dieses Keimgemisch wurde als letztes eingebracht und in Kultur genommen. Es entspricht hinsichtlich seiner Isolierfähigkeit, wie Tab. 1 b zeigt, durchaus den von BAARS beschriebenen Rassen, d. h. in der 5. Passage war das mit  $H_2S$  gezogene Material bereits frei von fakultativ-anaeroben Begleitorganismen, während dies durch Fortführen ohne  $H_2S$  nicht erreicht wurde. Eine der Isolierung von Stamm 2 analog ausgeführte Plattengußreihe zeigte das bereits von den Stämmen 2 und 3 geschilderte Kolonieverhalten. Auch hier war die Gewinnung von Reinkulturen möglich. Stamm 4 wird ebenfalls in ständiger Kultur gehalten. Aus den Beobachtungen wurde folgendes ersichtlich:

1. Von den im Einsaatmaterial mikroskopisch nachweisbaren zahlreichen Vibrionenkeimen gelangen, wie hier erstmalig gezeigt wird, in den Platten nur jene zur Entwicklung, die sich im unmittelbaren Umkreis der wenigen großen, offenbar erst entstandenen und meist durch  $FeS$ -Hof auffälligen Kolonien befinden, wobei zu sehen ist, daß mit der Größe des Abstandes von der fördernden Kolonie die entwicklungsanregende Wirkung rasch abnimmt. Ohne diesen zusätzlichen Einfluß vermag sich die Hauptmasse der Keime, jedenfalls diejenigen, die einzeln im Einsaatmaterial auftreten, nicht zu entwickeln.

Während VAN DELDEN diese Tatsache, daß sich auch bei dichten Keimaussaaten auffallend wenig Kolonien entwickeln, auf ein Absterben der meisten Keime durch zu hohe  $O_2$ -Spannung zurückgeführt hat, zeigen unsere Beobachtungen, daß das Ausbleiben der Entwicklung der Hauptmasse von Keimen auf dem Fehlen eines entwicklungsanregenden Stoffes beruht. Zu untersuchen bleibt, weshalb sich aber unter gleichen Bedingungen, einzelne Keime doch — und so rasch — zu Kolonien entwickeln können, daß sie durch ihre Stoffwechseltätigkeit die übrigen miteingesäten Keime, wenigstens in ihrer nächsten Umgebung, zur Entwicklung anzuregen vermögen.

2. Die bisher im Schrifttum als optimal empfohlenen Nährböden für Sulfatreduzierer (Lactat-Mineralsalz- bzw. Pepton-Glucose-Agar) ge-



statten also gar nicht den Eintritt der Vermehrung von einzeln liegenden Vibrionen; es kommt die Hauptmasse der eingesäten Keime gar nicht zur Entwicklung. Es fehlt beiden Nährböden also eine entscheidende Eigenschaft als unbedingt notwendige Voraussetzung für eine Einzelkeimvermehrung. Eine Koloniebildung erfolgt nur aus einem verschwindend kleinen Anteil der Einsaatkeime größerer Impfmengen (0,1—0,5 mm) — was auch schon VAN DELDEN (1904, S. 89) aufgefallen war — in den 1. und 2. und manchmal noch 3. Verdünnungsstufen (1:10), während nach der unmittelbar mikroskopisch festgestellten Einsaatkeimdichte und nach der tatsächlichen Dichte der später geförderten Kolonien eine Kolonieentwicklung noch in der 6.—8. Verdünnungsstufe zu erwarten ist.

3. Bei der Suche nach einer Erklärung hatte anfangs, wegen der Verwendung von Keimgemischen, die Annahme nahegelegen, den in manchen Kolonien auftretenden Stäbchen eine fördernde Wirkung zuzuschreiben. Nach den erfolgten Isolierungen konnte aber gezeigt werden, daß dieselbe entwicklungsanregende Wirkung von Kolonien ausgeht, die nur aus Vibrionen zusammengesetzt sind. Auch der Umstand, daß die einwandfreie Abimpfung der später aerobierfreien fördernden und geförderten Kolonien nach neuerlicher Aussaat wiederum zur Ausbildung der Kolonievorschiedenheit führte, legt den Gedanken an eine „Selbstförderung“ nahe.

Die Bedeutungslosigkeit der Begleitbakterien bzw. ihrer Stoffwechselprodukte für die Anregung des Vermehrungseintritts einzeln liegender Vibrionenzellen wird durch weitere eigene Versuchsreihen, über die in einem anderen Zusammenhang im einzelnen berichtet werden soll, gezeigt: Stoffwechselprodukte von Reinzuchten dieser Begleitorganismen, in abgestuften Mengen dem Substrat zugesetzt, waren nicht imstande, die einzeln eingesäten Reduzierkeime gleichmäßig zur Entwicklung schreiten zu lassen.

Als Test für die Reinheit der Reduzierkulturen gilt hier, wie in anderen Arbeiten, das dauernde Ausbleiben einer Kolonieentwicklung auf Bakteriennähragar unter aeroben Bedingungen<sup>1</sup>. Damit erscheint auch das Vorkommen des von *Spirillum desulfuricans* morphologisch nicht unterscheidbaren *Spirillum tenue*, das in den Versuchen BEIJERINCKS aufgetreten ist, und das — neuerdings von GIESBERGER (1936) — als obligat aerob beschrieben wurde, ausgeschlossen.

Es könnte allerdings noch gefragt werden, ob nicht, namentlich auf anaerob gehaltenen Pepton-Glucose-Nährböden, Anaerobier mitgezüchtet werden, die bei den ungünstigen Isolierungsbedingungen mitübertragen worden sind. Sorgfältige und häufige Beobachtungen der Aussaaten der

<sup>1</sup> Erwähnt sei allerdings, daß nicht immer alle Keime von fakultativen Anaerobiern auf Bakterienagar zur Entwicklung kommen und daß auch die einmalige mikroskopische Durchmusterung eigentlich kein Nachsverfahren darstellt.



reinen Stämme erlauben die Behauptung, daß niemals Stäbchen, weder in den Aussaaten noch in den sich aus ihnen entwickelnden Kolonien auftraten. Auch für das Vorkommen von zweierlei Vibrionen, nämlich reduzierender und nicht reduzierender, konnte kein Hinweis gefunden werden.

Mit der Erkennung der hier zugrunde liegenden Beziehung scheint die nutzlose Anwendung verfeinerter Isolierungsmethoden (BURRISCHE Tröpfchen- und Zehntelungsverfahren) aufgeklärt zu sein. Um bei dieser Sachlage das Einsetzen der Vermehrung in Lösungskulturen zur Untersuchung bestimmter Fragen zu sichern, wurde von uns deshalb durchgehend eine starke Beimpfung (3% der Kulturflüssigkeit) angewendet und ihre Nachteile zunächst mit in Kauf genommen.

4. Bisher wurde die FeS-Bildung um Kolonien zur Erkennung der Sulfatreduziererkolonien verwendet. Das Auftreten von „zweierlei“ Kolonien nach Aussaat in festem Substrat ist bereits BEIJERINCK aufgefallen, der diese Erscheinung aber nicht näher untersuchte. Er beschreibt nämlich in seinen Versuchen zwei stets auftretende Kolonietypen: solche mit FeS-Fällungshof und punktförmige, ohne Hof; reduktionsfähige Kulturen erhielt er jedoch nur durch Abimpfungen vom ersten Kolonietypus. — Die FeS-Bildung kann jedoch nicht als allein verlässliches Merkmal gelten, da eine Entstehung von FeS erstens an das Vorhandensein von gelöstem Eisen, zweitens an das Vorliegen bestimmter Bedingungen, vor allem einer bestimmten Konzentration der Wasserstoffionen (siehe EINSELE 1937, UTERMÖHLEN und GEORGI 1941) geknüpft ist. Inwieweit diese Bedingungen in der Umgebung der Kolonien, d. h. auf engstem Raum, gegeben sind, kann bei der Kompliziertheit des Stoffwechselgeschehens nicht näher gesagt werden. Tatsache ist, daß in den beschriebenen Versuchsanordnungen nur die erst entwickelten wenigen Kolonien einen solchen Fällungshof zeigen. Alle später erschienenen Reduziererkolonien können einen solchen offenbar mangels fällbaren Eisens nicht mehr ausbilden. Abimpfungen der hofbildenden sowohl wie auch der hoflosen Kolonien lassen immer wieder beide Koloniearten entstehen.

#### Identifizierung der gewonnenen Stämme.

Wie bereits einleitend gesagt, hat BAARS (1930) die Aufstellung der physiologischen Rassen von Sulfatreduzierern auf den von ihnen unterschiedlich verwertbaren organischen Substanzen als  $H_2$ -Donatoren gegründet. Zu diesem Zweck wurden von ihm eine lange Reihe von Substanzen auf ihre Eignung geprüft. Das wesentlichste Ergebnis besteht in der Erkenntnis, daß eine Gruppe von Sulfatreduzierern (*Vibrio Rubenshikii*) imstande ist, auch Fettsäuren, wie Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, als  $H_2$ -Donatoren zu verwenden.

Zur Überprüfung der von uns reingezüchteten Stämme wurden diese aus der Lactatvorkultur in Fläschchen mit Mineralsalzlösung, der die in Frage kommenden Substanzen zu 30 Millimol zugesetzt waren, eingepflegt (3% Impfmenge), und die H<sub>2</sub>S-Produktion nach 8 Tagen bestimmt. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt. — (Eine Weiterführung durch mehrere Passagen erfolgte hierbei nicht.) Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Tabelle 2 wiedergegeben, wobei eine H<sub>2</sub>S-Prod. ab 100 mg H<sub>2</sub>S/L als „+“ eingetragen wurde.

Tabelle 2. Verwendbarkeit einiger organischer Stoffe als C- und Energiequellen, geprüft an Keimgemisch 1, Stämme 2, 3 und 4.

Kulturdauer 7 Tage. Nährlösungsbasis: Lactat-Mineralsalzlösung ohne Lactat.

C-Quelle	<i>Vibrio</i> <i>Rubent-</i> <i>schikii</i>	<i>Vibrio</i> <i>desul-</i> <i>turicans</i>	Stamm <i>Steph-</i> <i>enson</i>	Keim- gem. 1	St <sub>2</sub>	St <sub>3</sub>	St <sub>4</sub>
Äthylalkohol .....	+	+	Ø	+	—	—	—
Na-Lactat .....	+	+	+	+	+	+	+
Glucose .....	+	+	—	+	+	+	—
Galaktose .....	+	—	?	+	+	+	—
Saccharose .....	+	—	—	—	+	+	—
Fructose .....	+	+	+	—	—	+	—
Na-Formiat .....	+	+	+	+	+	+	+
Na-Acetat .....	+	—	—	—	—	—	—
Na-Propionat .....	+	—	Ø	—	—	—	—
Na-Butyrat .....	+	—	—	—	—	—	—
Brenztraubensäure .....	+	+	Ø	+	+	+	+
Bernsteinsäure .....	+	+	+	—	—	—	—

Keiner der von uns untersuchten Stämme vermochte Acetat, Propionat oder Butyrat zu verwenden; es ist also keiner mit dem von BAARS aufgestellten polyphagen *Vibrio Rubentschikii* identisch. (Eine Verwandtschaft mit *Vibrio desulfuricans* liegt nahe.)

Wie uns aber aus zur Zeit im Gange befindlichen Untersuchungen jetzt schon deutlich wird (siehe S. 301), ist die Vermehrung der eingetragenen Keime nicht nur von der Impfmenge, den anaeroben Bedingungen und den zugesetzten organischen Substanzen abhängig, sondern es spielen wuchsstoffartige Stoffe noch unbekannter chemischer Zusammensetzung, die von den Reduzierern selbst gebildet werden, eine entscheidende Rolle. Es handelt sich also, ehe man ein abschließendes Urteil über die Brauchbarkeit eines Stoffes als Wasserstoffdonator abgeben kann, darum, festzustellen, inwieweit die gebotenen Versuchsbedingungen für die Bildung des entwicklungsanregenden Stoffes, wenn er nicht in genügender Menge mit der Impfflüssigkeit übertragen wurde (worauf wieder der physiologische Zustand dieses Impfmateri als Einfluß hat), günstig sind.

Solange es noch nicht möglich ist, Versuche durchzuführen, denen der fragliche Wuchsstoff absolut frei von anderen Stoffwechselprodukten in gleichbleibender Menge zugeführt oder entzogen werden kann, können

eigentlich die Ergebnisse aller Untersuchungen über die Donatorenfrage und auch die der vorliegenden Arbeit noch nicht als endgültig betrachtet werden.

Zur weiteren Identifizierung der gewonnenen Reduzierstämme wurde nach den allgemein gehaltenen Angaben von STEPHENSON und STICKLAND (1931) das Ferment Hydrogenase nachzuweisen versucht<sup>1</sup>.

Reinkulturen der Stämme 2, 3 und 4 und das Keimgemisch 1 wurden in je 600 cm<sup>3</sup> einer Nährlösung folgender Zusammensetzung eingepflegt: Dest. H<sub>2</sub>O; Fleischbrühe 25,00%; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5%; Na-Formiat 0,5%; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05%; NH<sub>4</sub>Cl 0,1%; MgSO<sub>4</sub> 0,2%.

Nach 5 Tagen anaerober Kultur wurden die Lösungen zentrifugiert, die Bakteriensuspensionen zweimal mit Ringerlösung<sup>2</sup> (NaCl 0,6%; CaCl<sub>2</sub> 0,04%; KCl 0,01%; NaHCO<sub>3</sub> 0,01%) gewaschen und in 25 cm<sup>3</sup> dieser Lösung aufgeschwemmt. Je 1 cm<sup>3</sup> der gewaschenen Suspension wurde in 1,5 cm<sup>3</sup> einer 0,01% igen Lösung von Methylenblau in einem Phosphatpuffergemisch von p<sub>H</sub> 6,3 eingetragen; die Proberöhrchen wurden in Anaerobengefäßen untergebracht und diese nach dem Evakuieren mit gereinigtem Wasserstoff gefüllt.

	Reduktionszeit/Std			
	Keimgemisch 1	St <sub>2</sub>	St <sub>3</sub>	St <sub>4</sub>
Bakteriensuspension in H <sub>2</sub> .....	5	4	6	3
„ im Vakuum .....		> 72		
Unbeimpft in H <sub>2</sub> .....		> 72		
Unbeimpft im Vakuum .....		> 72		

Trotz der viel längeren Reduktionszeit als die von STEPHENSON und STICKLAND für deren Stämme angegebene muß doch, im Vergleich zu den Kontrollversuchen, für die hier geführten Stämme auf die Fähigkeit, aktiv Methylenblau zu reduzieren, geschlossen werden.

Der qualitative Nachweis der Reduktion von Sulfaten mit Hilfe von molekularem Wasserstoff konnte durch H<sub>2</sub>S-Bildung in einem Phosphatpuffergemisch von p<sub>H</sub> = 7,4 + 0,6% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, das mit 1 cm<sup>3</sup> der wie oben vorbereiteten Bakteriensuspension beimpft worden war, erbracht werden. Ein Krystall MOHRschen Salzes in die beimpfte Versuchslösung eingebracht, war nach 24 Std anaerober Bebrütung in Wasserstoffatmosphäre vollkommen in FeS umgewandelt. Die unbeimpften und die im Vakuum aufbewahrten Versuche zeigten auch nach einer Beobachtungszeit von 10 Tagen keinerlei Veränderungen.

Keimgemisch 1, St<sub>2</sub>, St<sub>3</sub> und St<sub>4</sub> können demnach als Hydrogenasepositiv bezeichnet werden.

<sup>1</sup> Die erste Mitteilung konnte erst nach Beendigung dieser Arbeit eingesehen werden.

<sup>2</sup> Naturwissensch. 5, 431, 1934.



## Morphologisches Verhalten.

Von BEIJERINCK (1895), BAARS (1930) und STARKEY (1938) wurde übereinstimmend berichtet, daß es sich bei den Sulfatreduzierern um ungefähr  $4 \times 0,5 \mu$  große Organismen bzw. Spirillen mit Eigenbewegung handelt; die Organismen sind gramnegativ und lophotrich<sup>1</sup> begeißelt; seit STARKEY sind die sulfatreduzierenden Vibrionen als Sporenbildner bekannt.

Bemerkenswert ist die von STARKEY durch zahlreiche Abbildungen belegte große morphologische Variabilität von *Sporovibrio des.*; er wurde als Stäbchen, Coccus, Vibrio, Spirillum von 1 bis 6 Windungen, und als langer, sinusartig gewundener Faden, je nach den Kulturbedingungen und dem Alter der Kultur, gesehen. Daß es sich bei ihm um Reinkulturen handelte, wurde damit bewiesen, daß aerob gehaltene Kontrollausstriche auf Bakteriennähragar ohne Kolonieentwicklung geblieben sind. Eine morphologische Unterscheidung möglicherweise auftretender anaerober Begleitorganismen wäre — seiner Darstellung gemäß — wegen der großen Mannigfaltigkeit entstehender Zellformen (Stäbchen- und kokkenartige Organismen usw.) nicht möglich. Einen Beweis dafür, daß auch diese morphologisch abweichenden Zellformen zu *Sporovibrio des.* gehören, hat STARKEY darin erblickt, daß auch diese Populationen zur Sulfatreduktion befähigt waren.

Von unseren morphologischen Feststellungen an den in Agar und Lösung gezogenen Populationen soll hier vorläufig Nachstehendes vermerkt werden, weil es auf das hier Mitgeteilte Bezug hat.

Die Lösungen zeigen makroskopisch nach 3—6 Tagen zumeist eine leichte Trübung. Untersuchung der Population im Hängetropfen zeigt meist einzeln auftretende Vibrionen, die manchmal beweglich, meist jedoch unbeweglich sind. In jungen Kulturen sind Zellenpaare als Folge rascher Vermehrung reich vertreten. Ein verschieden großer Bruchteil der in älteren Kulturen (8—21 Tage) angetroffenen Zellen zeigt die Verlängerung zur Spirillenform mit höchstens einem Umgang. In manchen Versuchen fällt, ohne daß bisher bestimmte Beziehungen zu Außenbedingungen erkennbar geworden wären, auf, daß sich dichte Populationen entwickelt haben, in denen sich die Vibrionen in großen, dicht gefügten Klumpen vorfinden. Leider sind direkte Keimzahlbestimmungen durch die mikroskopische Zählung wegen der Klumpenbildung, oder indirekte durch das Plattengußverfahren wegen des Ausbleibens der Vermehrung (siehe S. 294), oder Keimgehaltsbestimmungen durch Volummessungen mit dem Hämatokriten wegen zu geringer Erträge noch nicht möglich.

Lebhaft bewegliche Zellen werden zumeist nur nach Übertragung der Zellen aus Agarkolonien beobachtet. In drei und mehr Wochen alten

<sup>1</sup> STARKEY schreibt dem *Sporovibrio desulfuricans* eine peritriche Begeißelung zu. Die Frage, ob die von MYERS 1940 auf der Begeißelungsweise und Zelllänge gestützte Trennung der Gattung *Vibrio* bzw. *Microspira* und *Spirillum* bei dem Auftreten beider Zellformen beim gleichen Organismus auf Grund der Begeißelungsweise allein (*Vibrio* = 1 Geißel, *Spirillum* = Geißelbündel) aufrecht erhalten werden kann, bedarf noch weiterer vergleichender Untersuchungen.



Lösungskulturen sind neben verzerrten Vibrionen nur unregelmäßig gestaltete Spirillen mit höchstens einem Umgang zu finden. Die meisten Zellen enthalten die für Spirillen eigentümlichen Tröpfchen.

*b) Einfluß von Sauerstoff auf Beginn und Verlauf der Sulfatreduktion.*

Bereits bei STARKEY (1938) findet sich ein Hinweis, daß die als besonders sauerstoffempfindlich beschriebenen Sulfatreduzierer sich in Kolonien, die mehr als 24 Stunden aeroben Verhältnissen ausgesetzt waren, lebhaft beweglich erhalten hatten, obwohl der die Kolonie umgebende FeS-Fällungshof bereits vollkommen oxydiert war. Die von STEPHENSON und STICKLAND (1931) durchgeführten Versuche zum Hydrogenasenachweis, die auch von uns wiederholt worden sind, hatten ebenfalls eine ziemlich große O<sub>2</sub>-Resistenz der Vibrionensuspension zur Voraussetzung, da die Vorbereitung und das Waschen der Suspension ungefähr 1 Std in Anspruch nimmt. Während dieser Zeit befinden sich die Organismen in Lösungen mit normaler Sauerstoffspannung.

Um den Grad der O<sub>2</sub>-Empfindlichkeit bzw. Resistenz solcher Suspensionen quantitativ angeben zu können, wurde der Inhalt eines gut gärenden Fläschchens (60 cm<sup>3</sup>) 15 min zentrifugiert, sodann einmal mit un-reduzierter Lactatlösung gewaschen und das Sediment in Lactat-Mineralsalzlösung aufgeschwemmt: gleiche Teile wurden nach verschiedenen Zeiten in Stöpselflaschen mit eben dieser Lösung eingimpft (Tab. 3). Die den Zeiten der Beimpfung entsprechende mikroskopische

Tabelle 3. Vergleich der H<sub>2</sub>S-Produktionen nach einer O<sub>2</sub>-Einwirkungszeit von 0 bis 50 Stunden.

Kulturdauer 7 Tage. Das Gesamtsulfat von 981 mg SO<sub>4</sub>''/L entspricht 348 mg H<sub>2</sub>S/L.

Beimpft nach	Stamm 2	Stamm 3	Beimpft nach	Stamm 2	Stamm 3
	mg H <sub>2</sub> S/L gefunden			mg H <sub>2</sub> S/L gefunden	
0'	326	335	12 <sup>h</sup>	289	287
40'	299	280	24 <sup>h</sup>	255	290
60'	283	305	50 <sup>h</sup>	273	246
150'	330	293			

Kontrolle ergab in allen Fällen dichte Suspensionen von Vibrionen: Zellen mit Eigenbewegung konnten hingegen nur ganz vereinzelt festgestellt werden.

Beim Arbeiten mit Zellsuspensionen läßt sich also eine Letalwirkung des Sauerstoffs an dem verwendeten Material innerhalb einer Einwirkungszeit von 50 Std nicht feststellen. Die Resistenz solcher Suspensionen gegenüber Luftsauerstoff ist demnach beträchtlich.

*c) Einfluß des Redoxpotentials und der H<sub>2</sub>S-Konzentration der verwendeten Nährböden auf die Art der Keimentwicklung. St.<sub>3</sub>*

Die auf S. 294 aus den Beobachtungen an Agarplatten gezogenen Schlüsse, daß eine Selbstförderung der Spirillen vorliegt, dürfte zunächst

daran denken lassen, daß vielleicht nur ein ungeeignetes Anfangs-Redox-potential des Nährbodens (Fehlen des  $\text{H}_2\text{S}$  allein) die Ursache für das Ausbleiben der Entwicklung der einzeln eingesäten Keime ist, daß also ein Vermehrungseintritt nur dort möglich ist, wo einige Reduziererkeime durch noch nicht näher bekannte Umstände doch zur Entwicklung gelangen und das Substrat für die in der Umgebung eingesäten Einzelzellen durch ihren Stoffwechsel geeignet machen. Folgende Versuchsanordnungen wurden zur Überprüfung dieser Möglichkeit verwendet:

Lactat-Mineralsalz-Agar, zu  $15\text{ cm}^3$  in Reagensröhrchen abgefüllt, wurde aufgekocht und aseptisch versetzt mit: a)  $\text{Na}_2\text{S}$ ; b)  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ; c)  $\text{H}_2\text{S}$ -Wasser. Die für eine Reduktion des Nährbodens notwendigen Mengen (3 Tropfen bzw. 1 Krystall) wurden in Vorversuchen ermittelt; als Indikator der erfolgten Reduktion diente eine Indigkarminlösung. Als Impfmateriale wurden Reinkulturen von Stamm 3 im Alter von 5, 14 und 30 Tagen verwendet. Die Impfmenge von  $0,1\text{ cm}^3$  der Vibrionensuspension wurde für alle Versuchsreihen beibehalten.

Mit diesem Material wurde ein Plattenguß mit drei Verdünnungsstufen angelegt und Sorge getragen, daß die Platten so rasch wie möglich mit alkalischer Pyrogallollösung zwecks  $\text{O}_2$ -Absorption eingeschlossen wurden. Zur Prüfung der Verläßlichkeit der Ergebnisse wurde jeder Plattenguß dreimal ausgeführt. Der Kontrollversuch wurde genau so, jedoch ohne die Zusätze von  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  und  $\text{H}_2\text{S}$ -Wasser angestellt.

Bei der Untersuchung der Platten nach siebentägiger Kulturdauer ließ sich kein Unterschied zwischen den Versuchsreihen mit und ohne Zusätzen feststellen; vielmehr kamen wiederum folgende Kolonietypen zur Entwicklung: a) Wenige Kolonien mit großem Schwärzungshof, in dem die eigentliche Kolonie nicht sichtbar ist. b) Große, schwarze, linsenförmige Kolonien mit nur angedeutetem  $\text{FeS}$ -Fällungshof. c) Sehr kleine, äußerst zahlreiche, hellbraune, linsenförmige Kolonien, die nur in nächster Umgebung schwarzumhöfter Kolonien zur Entwicklung gelangt sind. Zu ihrer Entwicklung ist also eine Substrateigenschaft notwendig, die erst durch die Tätigkeit der erst erschienenen  $\text{FeS}$ -fällenden Kolonien eintritt.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte in allen drei Kolonietypen Vibrionen bzw. Spirillen; betont sei, daß die Reinheit der von ihnen angelegten Kulturen auch in diesen Versuchsreihen durch den üblichen Test — Impfung in aerob gehaltene Bakteriennährböden — erwiesen wurde.

Die hoflosen Kolonien wurden in Reagensröhrchen und Stöpselflaschen mit Lactat-Mineralsalzlösung eingimpft; am 3. Tag nach der Beimpfung trat Eisensulfidfällung ein; der  $\text{H}_2\text{S}$ -Gehalt wurde in einer Probe mit  $340\text{ mg H}_2\text{S/L}$  bestimmt ( $348\text{ mg H}_2\text{S/L}$  als Sulfat zugesetzt). Die von der gleichen Kolonie in Bakteriennähragar ausgeführten Abimpfungen, aerob bebrütet, blieben ohne Keimentwicklung.

Das Fehlen des Schwefelwasserstoffs allein scheint somit in den Agarplatten nicht die unmittelbare Ursache des Ausbleibens der Vermehrung

von Einzelzellen zu sein. Aber wenn auch die obigen Versuchsreihen keinen Einfluß erkennen ließen, so bleibt selbstverständlich bestehen, daß der Schwefelwasserstoff — als reduzierendes Prinzip — eine der Bedingungen für den Eintritt der Sulfatreduktion darstellt.

Die Prüfung der im Laufe der Untersuchungen in Betracht gezogenen Erklärungsmöglichkeiten hat bis jetzt zusammenfassend Nachstehendes ergeben:

A. Die Möglichkeit, daß das Fehlen des Schwefelwasserstoffs allein die Koloniausbildung unterdrückt haben könnte, erscheint durch die vorliegenden Versuche wahrscheinlich, wenn nicht sogar sicher widerlegt.

B. Die Möglichkeit, daß verunreinigende Anaerobier, und zwar morphologisch von den Reduzierern nicht unterscheidbare Spirillen bzw. Vibrionen mit anderen Stoffwechselleistungen als Verunreinigung vorliegen, ist durch den auf S. 295 erbrachten Nachweis ausgeschieden.

C. Wenn auch erst weitere im Gange befindliche Untersuchungen, über die später berichtet werden wird, abgewartet werden müssen, ergibt sich doch schon jetzt aus den ermittelten Tatsachen zwanglos die Vorstellung, daß bei der Entwicklung der einzeln liegenden *Sporovibrio*-Zellen, neben dem die Anaerobie gewährleistenden Schwefelwasserstoff, ein neuartiger (JANKE 1939) biosähnlicher Stoff mitwirkt, der im Stoffwechsel der Sulfatreduzierer selbst entsteht und der das frischverwendete, unvollständige Nährsubstrat ergänzt. Dieser Stoff dürfte bei Massenimpfung in einer die weitere Vermehrung ermöglichenden Menge mit dem Impfmateriail miteingetragen werden. Bei Einimpfungen kleinerer Zellmengen hingegen, wie es namentlich bei den hohen Keimverdünnungen in dem einen oder anderen Isolierungsverfahren (Plattenguß, Zehntelungsverfahren) eingerichtet werden muß, würde also nicht jene vermehrungsanregende Konzentration vorliegen, außer dort, wo in eingetragenen Zellklumpen so viel des Stoffes eingeschlossen ist, daß von diesem als Kern der neue Bildungsprozeß ausgeht. In Lactat-Mineralsalzlösung (Flaschenversuch) ist es eine häufige Erscheinung, daß die FeS-Bildung im Bodensediment von einzelnen Punkten ausgeht und von hier aus sich allmählich in der ganzen Kulturflüssigkeit ausbreitet.

*d) Wirkung einiger anorganischer Verbindungen als Hemm- bzw. Spurenstoffe; Wuchsstoffbedürfnis.*

As, Co, Mn, P übten in der Konzentration von  $10^{-1}$  bei 6tägiger Kulturdauer eine Hemmung aus. Von der Konzentration  $10^{-6}$  an abwärts war weder Hemmung noch Förderung festzustellen.

Die weiter geprüften organischen Substanzen (Nikotinsäureamid,  $\beta$ -Alanin, Aneurin, Mesoinosit, Cebion, Na-Panthotenat in Konzentrationen von  $10^{-6}$  bis  $10^{-10}$ , Biotin  $10^{-7}$  bis  $10^{-10}$ ) lassen keinen experimentell



faßbaren Einfluß auf den Gärverlauf erkennen; wohl aber übt ein Zusatz von Hefeautolysat einen wachstumsfördernden Einfluß aus: Kolonien von Sulfatreduzierern lieferten, in Lactat-Mineralsalzagar + 0,01% Hefeautolysat eingepflegt, um das 3—6fache größere hofbildende Kolonien; auch die immer mit auftretenden hoflosen Kolonien waren im selben Verhältnis kräftiger entwickelt. Im Gärverlauf war keine Förderung zu erkennen.

### *Einfluß des Nitrats auf die Sulfatreduktion (Stamm 3).*

Aus ernährungsphysiologischen Betrachtungen früherer Autoren (BEIJERINCK 1895, VAN DELDEN 1904) und aus den Versuchen dieser Arbeit geht hervor, daß die Sulfatreduktion mit ziemlicher Sicherheit immer dann eintritt, wenn die Organismen anaerobe Verhältnisse und eine hinreichende Menge organischer Substanzen vorfinden. Als Stickstoffquelle können dabei sowohl organische (Aminosäuren) wie auch anorganische (Ammonsalze) Verbindungen dienen. Über Nitrat als Stickstoffquelle finden sich dagegen nur wenige Hinweise im Schrifttum; so bei VAN DELDEN (1904):

„... von den N-Verbindungen können Asparagin, Pepton und Ammonsalze durch die Spirillen assimiliert werden; Salpeter verhindert aber die Sulfatreduktion. Dieser Körper kann, in kleinen Quantitäten (bis  $\frac{1}{50}\%$ ) zugesetzt, durch unsere Spirillen als Stickstoffquelle benutzt werden, aber er wird unter Bildung von Nitrit und vielleicht von Ammoniak reduziert, und erst, wenn alles Nitrat und Nitrit aus der Flüssigkeit verschwunden ist, beginnt die Sulfatreduktion.“

Der Zweitgenannte von uns (CZURDA 1940; s. S. 202) zieht aus der Tatsache, daß bei Nitratzusatz die Sulfatreduktion in seinen Versuchen erst später eintritt, übereinstimmend mit VAN DELDEN den Schluß, daß die Spirillen erst das Nitrat reduzieren, ehe sie das schwerer reduzierbare Sulfat angreifen. Andere Autoren (BENECKE-JOST 1924, S. 371) schreiben den Sulfatreduzierern nicht die Fähigkeit zu, Nitrate abzubauen.

In den Arbeiten von MAASSEN (1901), STOKLASA und VITEK (1905) wird für eine große Anzahl von zur Anaerobiose befähigten Aerobiern Nitratreduktionsvermögen festgestellt (s. dazu die nachfolgende Mitteilung des zweiten von uns, V. DENK). In 30- bis 40tägigen Versuchen wurden bei Darbietung geeigneter C-Quellen rund 20%, in einem Einzelfalle bis zu 45% des gebotenen Nitratstickstoffs zu Ammoniak umgewandelt.

Die behauptete Hemmwirkung des Nitrats einerseits, die fehlenden quantitativen Untersuchungen andererseits ließen es erwünscht erscheinen, zunächst einige Fragen für die Gärung der sulfatreduzierenden Bakterien zu klären:

Zur Frage der Konzentrationswirkung des Nitrats wurde im Versuch die vollständige Lactat-Mineralsalzlösung mit  $\text{NO}_3'$ -Zusatz (geboden als  $\text{KNO}_3$ ) verwendet; nach einer Versuchszeit von 5, 8 und 21 Tagen wurde die Menge des gebildeten  $\text{H}_2\text{S}$  bestimmt. Um den Gärverlauf völlig unbeeinflusst (von  $\text{O}_2$ -Zutritt bei der Probeentnahme) ablaufen zu lassen, wurde für jede Bestimmung eine eigene Kulturflasche herangezogen. Die



Hemmwirkung des Nitrats war bereits bei 0,2%  $\text{KNO}_3$  ersichtlich und bei 0,3% eindeutig.

Bei Prüfung der Frage, inwieweit das Nitrat als alleinige N-Quelle dienen kann, zeigte sich, daß das Ammonsalz ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) völlig durch Nitrat ersetzt werden kann, ohne den Gärungsprozeß hinsichtlich Intensität und Ergiebigkeit in sicher erkennbarer Weise zu verändern. Das Nitrat kann von den Sulfatreduzierern in einer optimalen Konzentration von rund 0,01% als alleinige Stickstoffquelle verwendet werden.

Die weitere Frage nach der Brauchbarkeit der verschiedenen N-Quellen ergab, daß Ammonsalze, Nitrat und Aminosäuren (Leucin, Glykokoll, Asparagin) in gleicher Weise als Stickstoffquellen von den Sulfatreduzierern ausgenutzt werden können.

Um zu prüfen, in welchem Ausmaße Nitrat reduziert wird und wann die Sulfatreduktion einsetzt, wurden Glasstöpselflaschen mit Lactat-Mineralsalzlösung, in der das  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durch  $\text{KNO}_3$  ersetzt war, mit Rein-kulturen von Stamm 3 beimpft (3% Impfmenge). Nach 3, 7, 10 und 14 Tagen wurde der gebildete Schwefelwasserstoff und Ammoniak für jede Kulturflasche bestimmt. Die in der Tab. 4 zusammengefaßten Zahlen führen zu folgenden Feststellungen:

1. Von den 0,1%  $\text{KNO}_3$  (= 168 mg  $\text{NH}_3/\text{L}$ ) vermögen die Sulfatreduzierer nach 3 Tagen bereits 75—97% in  $\text{NH}_3$  umzuwandeln. Das ist eine Intensität der Nitratreduktion, wie sie bisher nicht bekannt war. Auf die Bedeutung dieser Vorgänge wird in der nachstehenden Mitteilung vom Zweitgenannten von uns eingegangen werden.

2. Die Nitratreduktion von *Sporovibrio desulfuricans* stellt keinen die Sulfatreduktion ersetzenden, sondern, soweit bis jetzt erkennbar geworden ist, einen von ihr unabhängig verlaufenden Vorgang dar, da sich zeigen ließ, daß beide Reaktionen nebeneinander ablaufen, wenn auch die Nitratreduktion früher einsetzt und zum Stillstand kommt als die Sulfatreduktion.

Tabelle 4. Nitrat- und Sulfatreduktion in gleichzeitig untersuchten Proben, beimpft mit Stamm 3.

NO <sub>3</sub> ' zugesetzt, berechnet als NH <sub>3</sub> mg/L	Versuchsdauer in Tagen				SO <sub>4</sub> '' zugesetzt, berechnet als H <sub>2</sub> S mg/L	Versuchsdauer in Tagen			
	3	7	10	14		3	7	10	14
	mg NH <sub>3</sub> /L gefunden					mg H <sub>2</sub> S/L gefunden			
168	125	139	153	156	276	38	216	243	248
168	152	160	163	—	276	31	234	250	—
336	84	176	—	210	276	109	128	127	126
336	85	190	197	—	276	127	129	133	—
504	179	212	272	206	276	Spuren			
504	181	270	—	—	276	„			

-- = Versuchsausfälle.

3. Durch Steigerung der  $\text{KNO}_3$ -Konzentration auf 0,3% (= 504 mg  $\text{NH}_3/\text{L}$ ) wird die Sulfatreduktion vollkommen gehemmt, während durch die Nitratreduktion noch 50% des gebotenen  $\text{NO}_3$  zu  $\text{NH}_3$  umgewandelt werden.

4. Die  $\text{NH}_3$ -Bildung kommt nach 7 bzw. 10 Tagen mit dem Erreichen eines Wertes von 95—97% zum Stillstand. Über den Verbleib der restlichen 3—5% müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, da in der vorliegenden Arbeit quantitative Nitratbestimmungen unterblieben sind.

Die Unabhängigkeit der Nitrat- von der Sulfatreduktion zeigen auch weitere Gärversuche, bei denen kein Sulfat, sondern neben Lactat ausschließlich Nitrat geboten worden ist. Die Versuche wurden in folgender Nährlösung durchgeführt:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,05%;  $\text{MgCl}_2$  0,02%;  $\text{KNO}_3$  0,1%; Na-Lactat 0,35%; dest.  $\text{H}_2\text{O}$  (Tab. 5).

Tabelle 5. Verlauf der Nitratreduktion in sulfatfreier Nährlösung, geprüft an Stamm 3.

Kultur- dauer Tage	$\text{NO}_3'$ zugesetzt und berechnet als mg $\text{NH}_3/\text{L}$	mg $\text{NH}_3/\text{L}$ gefunden	Rest- $\text{NO}_3'$ berechnet als mg $\text{NH}_3/\text{L}$	Kultur- dauer Tage	$\text{NO}_3'$ zugesetzt und berechnet als mg $\text{NH}_3/\text{L}$	mg $\text{NH}_3/\text{L}$ gefunden	Rest- $\text{NO}_3'$ berechnet als mg $\text{NH}_3/\text{L}$
0	168	0 (0,001)	168	3	168	160	8
2	168	39	129	3	168	156	12
2	168	38	130	7	168	170	—
3	168	24	144	7	168	165	3
3	168	25	143	14	168	167	1

Die Bestimmungen, die an mehreren Parallelversuchen in Glasstöpsel-  
flaschen vorgenommen wurden, zeigen eine hinlängliche Übereinstim-  
mung und beweisen das Stattfinden einer bisher nicht bekannten inten-  
siven Nitratreduktion durch die Sulfatreduzierer. Bei der mikroskopischen  
Kontrolle wurden gut bewegliche Spirillen von 1—1½ Windungen fest-  
gestellt. Die Untersuchungen werden fortgeführt.

### Zusammenfassung.

1. Aus der bisher unbekannt gewesenen Tatsache, daß sich von den  
im festen Substrat einzeln eingesäten *Sporovibrio*-Zellen nur jene zu  
Kolonien entwickeln, die in der Nähe von einzelnen raschwüchsigen  
 $\text{FeS}$ -fällenden Kolonien liegen, die aus morphologisch und physiologisch  
gleichartigen Vibrionen bestehen, einerlei, ob zu den mehrfachen Wieder-  
holungen Zellen aus einer der geförderten oder aus der einen fördernden  
Kolonie verwendet werden, wird geschlossen, daß a) dem für *Sporovibrio*  
*des.* empfohlenen und verwendeten Nähr- und Gärsubstrat ein für den  
Vermehrungseintritt unerläßlich notwendiger Stoff — etwa biosartiger  
Wirkung — fehlt, und daß b) der Stoff von den Sulfatreduzierern selbst

gebildet wird. Nur dort vermögen einzeln eingesäte Zellen im frischen Substrat zur Vermehrung zu schreiten, wo die Substanz in hinreichender Menge, entweder aus dem alten Substrat mitübertragen (Massenimpfung) worden ist, oder wo wahrscheinlich Zellklumpen von diesem Stoff so viel mitbringen, daß sie im festen Substrat selbst zu Kolonien voraus heranwachsen können und dabei durch Neubildung des Stoffes und seine Diffusion in das umgebende Substrat an den hier einzeln eingesäten Zellen die Vermehrung anregen.

Der Isolierungserfolg hing in unseren wie wohl auch anderen Arbeiten bis jetzt zu einem Teil von dem Gelingen der Entwicklungsanregung der einzeln eingesäten Zellen durch Voraneilen gewisser Kolonien ab. Eine Reihe von physiologischen Untersuchungen wird daher erst nach Aufklärung des Bioswirkung ausübenden Stoffes möglich werden.

2. Der Erfolg einer Isolierung wird zum andern Teil, wie erkannt wurde, durch die  $H_2S$ -Resistenz der Begleitorganismen, die in der Anreicherungskultur erhalten bleiben, bestimmt. Letztere ist größer als bisher angegeben.

3. Es wurden drei verschiedene Stämme von *Sporovibrio desulfuricans* isoliert, auf Verwertung von verschiedenen organischen Stoffen als  $H_2$ -Donatoren und Hydrogenasewirkung untersucht und mit anderwärts geprüften Stämmen verglichen. Die Reduzierer eines weiteren Keimgemisches konnten bis heute nicht isoliert werden.

4. Die  $O_2$ -Resistenz von Sulfatreduzierersuspensionen wurde quantitativ bestimmt und dabei eine beträchtliche Resistenz gegenüber Sauerstoff neuerlich festgestellt.

5. Die Wirkung einiger Elemente (As, Co, Mn, P) wurde in einem weiten Konzentrationsbereich  $10^{-1}$  bis  $10^{-10} \%$  untersucht. Mit der verwendeten üblichen Versuchsmethodik ist bei einer Konzentration unter  $10^{-6} \%$  keinerlei Einfluß — weder ein hemmender noch ein fördernder — auf die Gärung nachweisbar.

6. Anderwärts als Wuchsstoffe wirkende Substanzen — Nicotinsäureamid, b-Alanin, Aneurin, Mesoinosit, Cebion, Na-Pantothenat, Biotin, Hefeautolysat — bleiben ohne Einfluß auf die Sulfatreduktion; Hefeautolysat, festen Nährböden zugesetzt, wirkt wachstumsfördernd auf die Entwicklung der eingesäten Keime.

7. Es wird gezeigt, daß die Sulfatreduzierer imstande sind, Nitrat als eine vollwertige Stickstoffquelle an Stelle von Aminosäuren oder Ammonsalzen bis zu einer Konzentration von  $0.2\%$   $KNO_3$  zu verwenden. Die Nitratreduktion führt, wie hier erstmalig gezeigt wird, zu einer raschen und quantitativen Umwandlung des  $NO_3$  in  $NH_3$ .

Nitrat- und Sulfatreduktion laufen gleichzeitig nebeneinander ab.

## Literatur.

AYERS, S. H., u. W. M. T. JOHNSON jr.: J. Bacter. **9**, 115 (1924). — BAARS, J. K.: Over sulfaatreductie door Bacterien. Diss. Delft 1930. — BAVENDAMM, Th.: Abderhalden XII, 2, 1, 484 (1936). — BAUMANN, A.: Neue experimentelle Beiträge zur Biologie der Sulfatreduktion. Diss. Prag 1943. — BELJERINCK, M. W.: Zbl. Bakt. II, **11**, 49, 104, (1895). — BENECKE, W., u. L. JOST: Lehrbuch d. Pflanzenphysiologie. Jena, G. Fischer, 1924. — BUNKER, H. J.: Dept. of Sci. and Indus. Chem. Res. Special report No. 3, 1, London 1936. — CULLOCH, Mc E.: Disinfection and Sterilization. Lea & Febiger, Philadelphia 1936. — CZURDA, V.<sup>1</sup>: diese Z. **11**, 187 (1940). — DELDEN, A. VAN: Zbl. Bakt. II, **11**, 81, 113 (1904). — DENK, V.<sup>1</sup>: diese Z. **15**, 308 (1950) (die nachfolgende Mitteilung). — EINSELE, WILH.: Verh. intern. Ver. f. theor. u. angew. Limnologie **5**, III, Paris 1937. — ELION, L.: Zbl. Bakt. II, **63**, 58 (1924). — GAHL, R., u. B. ANDERSON.: Zbl. Bakt. II, **73**, 331 (1928). — GIESBERGER, G.: Beiträge zur Kenntnis der Gattung Spirillum Ehb. Diss. Delft, 1936. — GOSLINGS, A.: Zbl. Bakt. II, **13**, 385 (1904). — JANKE, A.: Zbl. Bakt. II, **100**, 409 (1939). — KLUYVER, A. J.: The chemical activities of the Microorganisms. Univ. London Press. 1931. — KUPFIS, J.: Zbl. Bakt. II, **76**, 48 (1928). — MAASSEN, A.: Kais. Ges.-Amt Berlin **18**, 21 (1901). — MYERS, J.: J. Bacter. **40**, 705 (1940). — RANK, A.: Beiträge zur Kenntnis der sulfatreduzierenden Bakterien. H<sub>2</sub>S-Bildung im Passugger Mineralwasser. Diss. Zürich, 1907. — RUBENTSCHIK, L.: Zbl. Bakt. II, **73**, 483 (1928). — STARKEY, R. L.: diese Z. **9**, 268 (1938). — STEPHENSON, M.: Bacterial metabolism. London 1930. — STEPHENSON, M., and L. H. STICKLAND: Biochem. J. **25**, 205, 215 (1931). — TREADWELL, F. P.: Analyt. Chem. II, Leipzig 1927. — UTERMÖHLEN jr., W., u. KARL E. GEORGI: J. Bacter. **40**, 449 (1941). — WEINBERG, M., R. NATIVELLE, u. A. R. PRÉVOT: Les microbes anaérobies, Monographie de l'Inst. Pasteur. Paris, Masson & Cie., 1937.

<sup>1</sup> Frühere Veröffentlichungen von V. DENK unter dem Namen V. CZURDA.



## Zur Frage der Ammonentstehung im Stoffkreislauf der Natur<sup>1</sup>.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

VIKTOR DENK.

(Eingegangen am 17. März 1944.)

Ammonentstehung, im Schrifttum als Ammonifikation oder Ammonisation bezeichnet, kann verschiedene biologische Vorgänge zur Grundlage haben. Wenn nur die bakteriellen berücksichtigt werden, lassen sich nachstehende unterscheiden: 1. Ammonentstehung im Zuge des Abbaues von N-haltigen organischen Stoffen (Aminosäuren), die als Desaminierung bezeichnet wird. 2. Ammonentstehung im Zuge der Luftstickstoffbindung. 3. Ammonentstehung im Zuge der Nitratreduktion. Auch die letztgenannte Entstehungsweise ist ein im Stoffkreislauf der Natur weitverbreitetes Geschehen, nicht nur ein Teilgeschehen bakterieller und mykologischer Gärungen, sondern darüber hinaus ein bei grünen und nicht grünen höheren Pflanzen weitverbreiteter Vorgang (WARBURG 1920, WARBURG und NEGELEIN 1920, KOSTYTSCHEW und TSWETKOWA 1921). Die Ammonentstehung der letztgenannten Art als Vorgang bakterieller Gärungen soll im nachfolgenden betrachtet werden.

Ehe auf die bisher bekannten Vorgänge näher eingegangen wird, muß eine nomenklatorische Frage geklärt werden. Nach der Gepflogenheit des Schrifttums werden Vorgänge, bei denen Ammon entsteht, als Ammonifikation bezeichnet. Da die Ausgangssubstanz einmal organische, ein anderes Mal anorganische N-haltige Verbindungen sein können, empfiehlt es sich, „Ammonifikation“ nur als übergeordnete Begriffsbezeichnung zu verwenden und die Entstehung von Ammon aus Aminosäuren und anderen organischen N-haltigen Stoffen mit „Desaminierung“, die aus anorganischen N-Quellen aber mit einem anderen Namen zu belegen. Man wird ferner gut tun, auch die Entstehung von Ammon im Zuge der Luftstickstoffbindung besonders zu benennen (siehe dazu LIPMANN 1911).

Wird zur Klassifizierung der Erscheinungen nicht wie bis jetzt das Gärungsprodukt, sondern der Ausgangsstoff herangezogen, so kann sich, wie es im Schrifttum der Fall ist, eine verschiedene Bezeichnungsweise ergeben. Die Ammonentstehung aus  $\text{NO}_3$  wird als Nitratreduktion an-

<sup>1</sup> Die Arbeit war in Band 13, Heft 5, S. 479 dieser Zeitschrift gedruckt worden und ging mit der Vernichtung des Heftes verloren. Im übrigen vergleiche man die Anmerkung zum Titel der vorstehenden Arbeit von A. BAUMANN und V. DENK (S. 283).

gesprochen, eine Bezeichnung, auf die man sich mit LÖHNIS 1910 besonders festlegen zu müssen glaubte, weil es üblich geworden war, darunter auch die Nitratreduktion zu verstehen, die zu elementarem Stickstoff führt. Für diesen oft untersuchten Vorgang ist es inzwischen üblich geworden, ihn als „Denitrifikation“ zu unterscheiden. Es ist zu erkennen, daß der Ausdruck „Nitratreduktion“ trotz der Festlegung eine übergeordnete Begriffsbezeichnung bleibt und daß es von Nutzen sein kann, für die Ammonentstehung aus  $\text{NO}_3$  einen besonderen Ausdruck zu prägen. Danach stünde eine der „Denitrifikation“ koordinierte Begriffsbezeichnung zur Verfügung. Als solche scheint vorderhand der Ausdruck „Nitratammonifikation“ brauchbar zu sein.

Die Ammonentstehung aus  $\text{NO}_3$  ist, wenn daraufhin das Schrifttum durchgesehen wird, keineswegs so gründlich untersucht worden wie etwa die Denitrifikation, der Desaminierungsprozeß oder die Luftstickstoffbindung, so daß es berechtigt erscheint, auf den in der vorstehenden Mitteilung behandelten, von meiner Schülerin A. BAUMANN 1943 aufgezeigten, in seiner Art erstmaligen Fall wegen seiner Bedeutung im Stoffkreislaufgeschehen der Natur näher einzugehen.

Eine Nitratreduktion zu Ammon über Nitrit als Zwischenstufe hat als bakterielle Umsetzung wohl als erster MARSHALL 1895 bei *Bacillus mycoides* nachgewiesen. Die zu dieser Zeit lebhaft untersuchte Denitrifikation führte u. a. wohl auch MAASSEN 1901 dazu, weitere heterotrophe Bakterienarten auf die Fähigkeit zur Ammonbildung aus Nitrat zu prüfen. 27 der untersuchten Arten waren befähigt, auf einem Malat-Mineralsalz-Nährboden Ammon aus  $\text{NO}_3$  zu bilden. Es ist freilich in diesen Fällen zu keiner größeren Anhäufung gekommen, so daß es den Anschein hatte, als würde im wesentlichen nur soviel umgesetzt werden, als für eine N-Assimilation bereitgestellt werden mußte. Es sind indessen von ihm keine Bilanzversuche angestellt worden, die eine genauere Beurteilung des umgesetzten Anteils erlauben würden.

Kurz darauf haben BEIJERINCK und VAN DELDEN 1902 (S. 42) gelegentlich der Untersuchungen über die Assimilation des Luftstickstoffs durch *Azotobacter chroococcum* den Nachweis liefern können, daß dieser Organismus wie zwei andere herangezogene Bakterienarten (*Bacillus mesentericus vulg.* und *Bacillus subtilis*) Ammon entstehen lassen können, daß jedoch im ersten Fall die Nitratammonifikation anscheinend direkt, ohne Nitrit als Zwischenstufe zu durchlaufen, stattfindet, während die beiden *Bacillus*-Arten Nitrit nachweisen lassen. Auch aus der Tatsache, daß diese beiden im Gegensatz zu *Azotobacter* Nitrit nicht zu Ammon zu reduzieren vermochten, wurde auf eine Verschiedenheit der Reduktionsprozesse in den beiden Fällen geschlossen. Einzelheiten über den Untersuchungsvorgang fehlen, so daß nicht zu erkennen ist, ob auch quantitative Bestimmungen erfolgt sind.

Solche sind in eingehender Weise von STOKLASA und VITEK 1905 bei einer ganzen Reihe von Bakterienstämmen vorgenommen worden. Sie zeigten damit, daß verschiedene bekannte Bakterien zur Ammonbildung aus Nitrat befähigt sind: *Proteus vulgaris* (2,81), *Proteus zenkeri* (13,1), *Bacillus ramosus non liquefaciens* (3,3), *Bacillus mycoides* (20,7), *Bacillus subtilis* (2,4), *Bacillus megaterium* (8,6), *Clostridium gelatinosum* (14,5). Die hinter den Namen in Klammern angeführten Zahlen geben die % des zu Ammon ( $\text{NH}_3$ ) umgesetzten, als 0,2% ige Lösung gebotenen  $\text{NaNO}_3$  bei Darbietung von Glykose als Kohlenstoffquelle an. Die Dauer der Versuche betrug 30 bis 50 Tage. Bei Darbietung von anderen Hexosen blieb der

umgesetzte Teil weit hinter den genannten Zahlen zurück. Bemerkenswert ist, daß *Clostridium gelatinosum* bei Darbietung von Arabinose in 45 Versuchstagen einen Umsatz von 45% des gebotenen Nitrats gezeigt hat.

In der Folgezeit wurden weitere experimentelle Befunde durch qualitative und quantitative Untersuchungen von KLAESER (1914) gebracht, die die Beobachtungen von MAASSEN, STOKLASA und VITEK in der Richtung bestätigen, daß auch noch andere saprophytische Bakterien die Fähigkeit besitzen, zum Teil in erheblichem Ausmaß (*Bacillus subtilis*) Nitrat in Ammon umzusetzen. Da jedoch Kontrollversuche fehlen, bedürfen diese Versuche noch der Nachprüfung, bei der unter anderem auch die Ammonentstehung im Verlaufe mehrerer, aneinander schließender Gärfolgen („Passagen“) festzustellen wäre, da es bei verschiedenen Gärvorgängen hinreichend viele Beispiele dafür gibt, daß die in der ersten Gärfolge gewonnenen Ausbeuten in der zweiten oder nächsten Folge stark oder auf Null absinken können.

Trotz dieser Befunde schließt KLAESER (S. 422), „daß es sich bei der Reduktion der Nitate zu Nitrit und zu Ammoniak um einen Prozeß handelt, der den Bakterien zur Deckung ihres Stickstoffbedarfs dient, also zum plastischen Teil des Stoffwechsels gehört . . . Von einer Ammoniakgärung zu sprechen, wie es KRUSE 1910 nach den Ergebnissen von MAASSEN, dessen Bakterien häufig größere Ammoniakmengen anhäuften, für möglich hält, ist kein Grund vorhanden. Diese Ammoniakaufspeicherung, die auch in unserem Fall häufig vorhanden war, kann man sich auch auf die gewöhnliche Weise durch Reduktion erklären.“

Sonst finden sich im Schrifttum keine weiteren experimentellen Beiträge, die das über die Nitratammunifikation Bekannte vertiefen würden (siehe RIPPEL 1939). Wohl aber finden sich zahlreiche Beiträge zu den Nitratreduktionsvorgängen, die als Denitrifikation bezeichnet zu Nitrit und elementarem Stickstoff führen.

Die Ermittlungen von BAUMANN zur Frage des Nitratinflusses auf die Sulfatreduktion stellen somit neue und wichtige Befunde dar. Neben dem Nachweis, daß Sulfatreduzierer auch Nitate in hervorragender Weise zu reduzieren vermögen, wird gezeigt, daß 1.  $\text{KNO}_3$  bei einer Konzentration von 1000 mg/l mit Lactat geboten in 4 Tagen praktisch quantitativ zu Ammon reduziert wird, daß 2. die beiden Reduktionsprozesse gleichzeitig, am Nitrat mit größerer, am Sulfat mit geringerer Intensität ablaufen und daß 3. die Nitratreduktion die Rolle der Sulfatreduktion in dem Oxydoreduktionsvorgang wenigstens teilweise übernehmen kann. Wir haben es somit mit einem Vorgang zu tun, der durch die Intensität seines Ablaufes ein biochemisches Geschehen darstellt, dem im Stoffkreislauf der Natur eine besondere Rolle zukommen muß und für das, wenn man will, die von KRUSE erwogene, von KLAESER abgelehnte Bezeichnung „Ammoniakgärung“ verwendet werden könnte.

In eutrophen Seen, deren Großräumigkeit das Stoffkreislaufgeschehen während der Stagnationsperiode in der Vertikalverteilung der Stoffe besonders klar zum Ausdruck bringt, führen die epilimnischen Wassermassen den Stickstoff als Nitrat, die hypolimnischen als Ammonverbindungen. In der Sprungschicht finden sich bisweilen Spuren von Nitrit (s. RUTNER 1940, S. 65, 72). Der Übergang von den Nitrat- zu



den Ammon-führenden Wassermassen ist derart, daß auf eine rasche Umsetzung während der Sommerstagnation geschlossen werden muß. Zur Erklärung dieser Erscheinung wird nach RUTTNER 1940 (S. 65) angenommen, daß die mit der Herbstzirkulation hinabgelangten Nitratmengen der Denitrifikation verfallen, also als elementarer Stickstoff verloren gehen, und daß die nachweisbaren Ammonmengen des Hypolimnions aus Eiweißabbauvorgängen herrühren. Gegen die Richtigkeit dieser Annahme sprechen (nach mündlicher Mitteilung von Prof. RUTTNER) die Ergebnisse hydrochemischer Untersuchungen der organischen Stickstoffverbindungen und des Ammons, die das zu erwartende Mengenverhältnis auch nicht annähernd zeigen. Beim Lunzer Obersee behelf man sich mit der Annahme, daß der ausgedehnte Schwingrasen die Ausgangsstoffe für die Ammonbildung liefere.

Der Nachweis einer so rasanten Nitratreduktion durch reingezüchtete Sulfatreduzierer läßt die im Hypolimnion vorkommenden Ammonmengen nicht mehr als Ergebnis eines Eiweißabbaues auffassen. Zur näheren Prüfung der Bedeutung der Nitratammonifikation unter den im Lunzer Obersee gegebenen hydrochemischen Verhältnissen wurden nachstehende Versuche unternommen, mit denen ermittelt werden sollte, bis zu welchem Ausmaß die im natürlichen Wasser vorkommenden organischen Stoffe als H-Donatoren und Energiequellen einer Nitratreduktion durch die natürliche Biocoenose und durch die reingezüchteten *Sporovibrio* dienen können.

Es wurden epilimnische Wasserproben aus 3,5 m Tiefe und hypolimnische Wasserproben aus 12 m Tiefe mit dem großen Wasserschöpfer der biologischen Station Lunz am See aus dem Obersee am 6. September 1943 entnommen und in Schottischen Milchflaschen luftblasenfrei für den Transport untergebracht, da der Gäransatz an Ort und Stelle wegen der Vorbereitung gewisser Kontrollen nicht ausgeführt werden konnte. Zur Zeit der Probeentnahme herrschte im See nachstehende Sauerstoff- und Temperaturverteilung, die Herr Prof. RUTTNER im Zuge seiner eigenen Untersuchungen ermittelt (3. September) und für die vorliegende Mitteilung in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt hat.

Tiefe in m	Temperatur	O <sub>2</sub> mg/Liter	Tiefe in m	Temperatur	O <sub>2</sub> mg/Liter
1	13,4	9,81	8,5	5,6	0,86
3	10,7	10,10	10,0	5,4	0,44
5	9,1	10,12	11,0	5,25	0,24
7	7,9	9,67	12,0	4,95	0,17
7,5	7,0	—	14,0	4,6	0,18
8,0	—	0,82			

Bis zur Verarbeitung der Proben im Prager Laboratorium wurden sie, die Zeit des Bahntransportes ausgenommen, im Kühlschrank bei  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  gehalten. Mit ihnen wurden nachstehende Gäransätze in je dreifacher Ausführung in sterilen 40 cm<sup>3</sup> Glasstöpselflaschen eingerichtet und



der Stoffumsatz der Lösung nach 3 bzw. 6 Tagen durch kolorimetrische Ermittlung der vorhandenen Ammonmenge festgestellt.

I. Mit SCHOTT'schem Bakterienfilter (Nr. 4117) *entkeimte Teilprobe* wurde ohne weiteren Zusatz aseptisch in den Fläschchen untergebracht, um die natürlicherweise zur Zeit der Probeentnahme (bzw. Versuchsbeginn) vorhandene Ammonmenge kennenzulernen.

II. In einer anderen, in gleicher Weise *entkeimten Teilprobe* wurde durch Zusatz von 1 cm<sup>3</sup> einer sterilen 5%igen KNO<sub>3</sub>-Lösung der Nitratgehalt auf 1150 mg/l gebracht und die so vorbereitete Teilprobe aseptisch in den Fläschchen verschlossen, um festzustellen, ob auch ohne Tätigkeit von Mikroorganismen ein Nitratabbau zu Ammon stattfindet.

III. Eine weitere in der gleichen Weise *entkeimte Teilprobe* wurde mit 1 cm<sup>3</sup> einer sterilen 5%igen KNO<sub>3</sub>-Lösung (Nitratgehalt der Versuchslösung = 1150 mg/l) und 1 cm<sup>3</sup> einer 6 Tage alten Kultur in flüssiger Nährlösung von *Sporovibrio desulfuricans* Stamm 3 versetzt und in den Fläschchen aseptisch verschlossen, um zu ermitteln, wieviel Ammon aus dem gebotenen KNO<sub>3</sub> bei der gegebenen Beschaffenheit des Standortwassers (Gehalt an organischen H-Donatoren und Energiequellen) gebildet wird. Mit dem einen Kubikzentimeter Impfflüssigkeit wurden den 40 cm<sup>3</sup> Versuchslösung rund 0,28 mg Schwefelwasserstoff zugeführt, so daß eine Anfangskonzentration von rund 7 mg/l H<sub>2</sub>S eingerichtet war. Damit war für das notwendige anfängliche Redoxpotential selbst bei weitgehendem Verbrauch des H<sub>2</sub>S zur O<sub>2</sub>-Vernichtung gesorgt.

IV. Mit einer *nicht entkeimten Teilprobe* wurde in der gleichen Weise wie Probe III ein Gäransatz vorbereitet, um zu erfahren, wieviel Ammon durch die natürliche Bakterienflora aus dem gebotenen KNO<sub>3</sub> entstehen kann.

V. Mit einer weiteren *nicht entkeimten Teilprobe* wurde schließlich in der gleichen Weise wie Probe IV ein Gäransatz eingerichtet, um die Ammonmenge kennenzulernen, die durch Zusammenwirken der natürlichen Keime mit denen des *Sporovibrio desulfuricans* Stamm 3 aus dem gebotenen Nitrat gebildet werden kann.

Das Standortwasser aus 3,5 m Tiefe wurde aus äußeren Gründen nur zu einem Gäransatz, und zwar dem Versuch IV entsprechend (natürliches Keimgemisch und 1 cm<sup>3</sup> einer 5%igen KNO<sub>3</sub>-Lösung), verwendet und aseptisch in den Versuchsgefäßen untergebracht. Diese Probe hatte die Reduktionsfähigkeit des in diesen Wasserschichten vorkommenden natürlichen Keimgemisches, das allerdings am Standort nicht unter aseptischen Bedingungen entnommen war, sicherzustellen.

Die Füllung der Fläschchen geschah in der Weise, daß in die sterilen Versuchsgefäße zunächst ein größerer Teil der Wasserprobe eingebracht und die Zusätze hinzugefügt wurden. Danach wurden die Fläschchen mit der Teilprobe angefüllt und luftblasenfrei verschlossen. Alle Fläschchen

wurden im Dunkeln bei 25° C bebrütet. Das Ergebnis der Bestimmungen ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt. In ihr ist nicht verzeichnet der Eintritt der Graufärbung der Lösung im Versuch V der hypolimnischen Wasserprobe durch FeS-Bildung als Folge einer Sulfat-reduktion. Die Ergebnisse der geschilderten Vorversuche besagen folgendes:

Versuchslösung: Standortwasser	Ammongehalt in mg/Liter					
	Probe aus 12 m Tiefe Versuchsdauer in Tagen			Probe aus 3,5 m Tiefe Versuchsdauer in Tagen		
	3	6	6	3	6	6
I. steril ohne Zusätze .....	—	0,06	0,06	kleiner als 0,001		
II. steril mit 1150 mg Kaliumnitrat	0,12	0,1	0,15	—		—
III. steril mit 1150 mg Kaliumnitrat und Sulfatreduzierer.....	8,0	8,0	6,0	—		—
IV. Natürliche Keime und 1150 mg Kaliumnitrat .....	0,85	0,9	0,75	0,15		0,25
V. Natürliche Keime und 1150 mg Kaliumnitrat und Sulfat- reduzierer .....	9,0	9,0	7,0	—		—

1. Das natürliche Keimgemisch der 12 m-Tiefe vermag schon in der Zeit von 3 Tagen 0,5—0,6 mg/l Ammon aus Kaliumnitrat als Maximalmenge umzusetzen.

2. Die der 12 m-Tiefenprobe zusätzlich zugeführten Sulfatreduzierer vermögen auf Kosten der natürlicherweise vorhandenen und mit der Impfflüssigkeit mitgebrachten<sup>1</sup> organischen H-Donatoren in der gleichen Zeit noch weitere, etwa 4—6 mg/l Ammon aus dem zugesetzten Nitrat zu bilden. Gleichzeitig tritt eine leichte Sulfatreduktion ein<sup>2</sup>.

3. Die dem Standort nicht einmal besonders aseptisch entnommene epilimnische Wasserprobe aus 3,5 m Tiefe läßt bei dieser Versuchsanordnung keine größenordnungsmäßig ähnliche Ammonentstehung erkennen.

4. Die auf Kosten der vorhandenen organischen H-Donatoren mögliche Nitratammonifikation ist praktisch schon nach 3 Tagen abgeschlossen, da nach weiteren Versuchstagen keine Steigerung des Ammongehalts zu sehen ist. Die Erschöpfung an geeigneten Donatoren bzw. Energiequellen stellt anscheinend den begrenzenden Faktor dar.

<sup>1</sup> Die Menge an mit der Impfflüssigkeit mitgebrachten H-Donatoren (Lactat) wurde nicht bestimmt. Nach der Menge an gebildetem H<sub>2</sub>S (280 mg/L) zu schließen, konnten noch ausschlaggebende Mengen an Lactat und Abbauprodukten (Acetat) eingetragen worden sein. Die eingetragene NH<sub>4</sub>-Menge konnte maximal rund 0,3 mg/L betragen.

<sup>2</sup> Sie ist offenbar durch die Lebensgemeinschaft an Sulfatreduzierern hervorgerufen, an der von mir (CZURDA 1940) die auffallende Tatsache beschrieben worden ist, daß durch sie eine Sulfatreduktion auch bei Ausschluß von bekannten H-Donatoren eintritt.

Mit diesen Vorversuchen ist gezeigt, daß die in der Natur in hypolimnischen Wasserschichten der Seen und wohl auch in anderen sauerstoffarmen bzw. -freien, an organischen Stickstoffverbindungen armen Biotopen vorkommenden Ammonmengen nicht aus Desaminierungsprozessen, sondern aus einer in ihrer Wirksamkeit noch nicht bekannt gewesenen Nitratreduktion stammt, die als einer der im Stickstoffkreislauf der Natur ausschlaggebenden Vorgänge anzusehen ist und mit anderen schon bekannten Fällen zusammen als Nitratammonifikation bezeichnet werden soll. Wenn der Umsatz des Nitrats zu Ammon als natürliches Vorkommen bereits angenommen werden konnte (BUCHANAN und FULMER, 1930, Bd. III, S. 192, STEPHENSON 1930, S. 99, KRUSE 1910, S. 612), so hat es sich doch bei den dieser Annahme zugrunde liegenden Fällen um infolge ihrer geringen Umsatzgeschwindigkeit wenig wirksame Umsetzungen gehandelt, die meist, wie jetzt zu sehen ist, praktisch nicht zur Auswirkung kommen dürften. Wenn hier zusammen mit der vorhergehenden Mitteilung die Nitratammonifikation in ihrer Wirksamkeit im künstlichen und natürlichen Substrat an *Sporovibrio desulfuricans* dargestellt werden konnte, so ist wohl außer Zweifel, daß damit nur einer von mehreren möglichen Fällen aufgezeigt worden ist. Es ist zu vermuten, daß noch andere, besonderen Stoffwechselgruppen zugezählte und dementsprechend anders benannte Anaerobier an der gleichen Umsetzung im Zuge ihrer Oxydoreduktionsvorgänge teilnehmen dürften.

In dem hier aufgezeigten Vorgang liegt das Gegenstück zur Nitrifikation vor.

### Literatur.

- BAUMANN, A.: Diss. Prag, 1943. — BAUMANN, A., u. V. DENK: diese Z. 15, 283, 1950 (vorstehende Mitteilung). — BEIJERINCK, M. W., u. VAN DELDEN: Zbl. Bakt. II, 9, 3 (1902). — BUCHANAN, R. E., u. E. J. FULMER: Physiology and Biochemistry of Bacteria. London 1930. — CZURDA, V.<sup>1</sup>: diese Z. 11, 187 (1940). — KLAESER, M.: Zbl. Bakt. II, 41, 365 (1914). — KOSTYTSCHEW, S., u. E. TSWETKOWA: Z. physiol. Chem. 111, 171 (1921). — KRUSE, W.: Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910. — J. G. LIPMANN: Bot. Gaz. 51, 454 (1911). — LÖHNIS, F.: Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie. Berlin 1910. — MAASSEN, A.: Arb. Gesundh.-Amt 18, 1 (1901). — MARSHAL, E.: Agr. Sci. 8, 574 (1894). — RIPPEL, A. in E. BLANCK: Handbuch d. Bodenlehre, I. Erg.-Bd., 547 (1939). — RUTTNER, F.: Grundriß der Limnologie. Berlin 1940. — STEPHENSON, M.: Bacterial Metabolism, London 1930, 1939. — STOKLASA, J., u. E. VITEK: Zbl. Bakt. II, 14, 102 (1905). — WARBURG, O., Naturw. 8, 266 (1920). — WARBURG, O., u. E. NEGELEIN: Biochem. Z. 110, 66 (1920).

<sup>1</sup> Frühere Veröffentlichungen von V. DENK erschienen unter dem Namen V. CZURDA.



(Aus dem Institut für Technische Mykologie der T. H. München in Weihenstephan.)

## Beiträge zur Physiologie und Technologie der Fettbildung bei Mikroorganismen<sup>1</sup>.

Von

KARL LUDWIG SCHULZE.

Mit 14 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. September 1949.)

Während des letzten Krieges wurde an verschiedenen Laboratorien versucht, die Frage der mikrobiologischen Fettsynthese weiter zu klären und, wenn möglich, einer technischen Lösung näherzubringen. In die Reihe dieser Versuche gehören auch die im folgenden beschriebenen Arbeiten (K. L. SCHULZE, 1940, 1941), die in den Jahren 1942—44 zur erstmaligen großtechnischen Erzeugung einer fettreichen Hefe aus Sulfitablauge führten<sup>2</sup>.

### I. Ein neues Verfahren zur kontinuierlichen Züchtung deckenbildender Mycelpilze.

Die ersten Versuche<sup>3</sup> strebten eine Verbesserung des seit den bahnbrechenden Arbeiten von LINDNER (1922) allgemein verwendeten Oberflächen-Züchtungsverfahrens an. Es ist bekannt, daß die technische Durchführung dieses Verfahrens vor allem daran scheiterte, daß zuviel teure Oberflächen für die Kulturschalen und zuviel Handarbeit für deren Entleerung und Neueimpfung erforderlich war.

Als Nährlösung wurde Molke benutzt. Etwa 30 verschiedene Mikroorganismen-Stämme wurden aus natürlichen Vorkommen auf Quark und Molke isoliert und auf Wuchsfreudigkeit sowie Fettbildungsvermögen geprüft. Darunter zeichneten sich mehrere aus, die wahrscheinlich der Art *Trichosporon cutaneum* angehörten<sup>4</sup>. Diese

<sup>1</sup> Gekürzte Wiedergabe einer Habilitationsschrift, die 1949 bei der T. H. München unter dem gleichen Titel eingereicht wurde. Die Literatur über die autotrophen fettbildenden Mikroorganismen (Diatomeen, Grünalgen) ist nicht mit berücksichtigt worden.

<sup>2</sup> Berichtet wurde darüber erstmals auf der Arbeitstagung des Vereins der Zellstoff- und Papierchemiker u. -Ingenieure am 26. November 1942 in Darmstadt in einem Vortrag von E. SCHMIDT. Ein Referat dazu erschien 1943 in „Die Chemie“ 56/93. Kurz zuvor veröffentlichte C. KRAUCH in „Der Deutsche Chemiker“ 9/3 (1943) einen Bericht über die Entwicklung der industriellen Chemie seit 1933, wo sich der Abschnitt „Gärungschemie“ auf das von mir entwickelte Verfahren bezieht. 1947 brachte die „Angewandte Chemie“ 59/16 eine Publikation von E. SCHMIDT, worin der Abschnitt über die Fetttheferzeugung eine zum Teil unkorrekte Darstellung meiner Arbeiten gibt. Der Name des Verfassers wurde in diesen Veröffentlichungen nicht genannt.

<sup>3</sup> Durchgeführt 1940 am Institut für Mikrobiologie der Univ. Göttingen, Dir.: Prof. Dr. A. RIPPPEL-BALDES.

<sup>4</sup> Nach mündlicher Mitteilung von Herrn Dr. S. WINDISCH, T. H. München.



Art hat morphologisch und physiologisch Ähnlichkeit mit dem von LINDNER verwendeten *Endomyces vernalis* und ist synonym mit *Oospora moniliaformis*. (WEIGM. et WOLFF). Sie assimiliert Lactose gut und besitzt kein Gärvermögen. Auf ruhender Nährlösung bildet sie weiße bis cremfarbige, gefaltete Decken. Der Milchzucker-gehalt der verwendeten Molken lag im Durchschnitt bei 3,6%. Der Milchsäuregehalt betrug etwa 0,6%. Dazu müssen als C-Quellen noch geringere Mengen an Zitronensäure gerechnet werden, die in Molken ebenfalls enthalten ist. Die optimale Temperatur betrug 24° C. Temperaturen über 35° C führten bereits zu Schädigungen der Kulturen. Der optimale pH-Wert ergab sich zu 4,5—5,0, dem Wert, den Molken meist von Natur aus besitzen. Er verschob sich im Laufe des Wachstums stets auf pH 7 und darüber, da die Milchsäure und wohl auch die Zitronensäure assimiliert werden. Die Milchsäure wurde sogar rascher verbraucht als der Milchzucker. In einem Fall war der pH-Wert von 4,6 auf 6,8 gestiegen, während der Milchzucker erst um  $\frac{1}{4}$  abgenommen hatte.

Da mit den ansteigenden pH-Werten das Bakterienwachstum stark gefördert wird, erwies es sich als zweckmäßig, den Molken 0,1% Ammonsulfat hinzuzufügen. Molke enthält relativ wenig assimilierbaren Stickstoff, das  $\text{NH}_4$ -Ion wird daher rasch verbraucht und das freiwerdende  $\text{SO}_4$ -Ion kompensiert die aufgenommene Milchsäure. Auf diese Weise wird neben der Zufuhr von assimilierbarem Stickstoff gleichzeitig eine Regulation des pH-Wertes erreicht. Der Zusatz von Wirkstoffen wie Vit. B<sub>1</sub> oder Spurenelementen wie Kupfer, Eisen, Zink und Mangan ergab keine Steigerung der Erträge. Dagegen zeigte sich, daß die Wuchsform des Mycel durch derartige Zusätze stark verändert werden konnte, so daß z. B. nur noch submerses Mycel entstand. Jedoch konnten diese Fragen, insbesondere die der Submers-Züchtung damals nicht weiter verfolgt werden.

Zugaben von Phosphorsalzen steigerten und beschleunigten das Wachstum deutlich. Dabei sank jedoch der Fettgehalt. Gleichzeitig waren morphologische Veränderungen feststellbar. Es bildete sich mehr fädiges Mycelgeflecht, während ohne Phosphatzusatz ein stärkerer Zerfall in Oidien und Sproßconidien eintrat.

Bei der Kultur auf ruhender Nährlösung in PETRISchalen war nach 5 Tagen das Maximum an Pilzsubstanz erreicht. Die Ausbeuten betrugen 18—21 g Trockensubstanz je Liter Molke. Der Rohfettgehalt der geernteten Mycelien lag bei 23—36%, bezogen auf Trockensubstanz. Im Mittel wurden 26% Rohfett und 16% Rohprotein festgestellt. Die Fettbestimmung erfolgte nach der Methode von SCHMID-BONDZINSKY, die auch GEFFERS (1937) angewandt hat. Bei durchschnittlich 20 g Pilztrockensubstanz je Liter Molke ergaben sich demnach folgende Ausbeuten

Tabelle 1. Vergleich zwischen *Trichosporon*, *Endomyces* und *Oospora*.

Organismus und Rohstoff	je 100 g angewandter Zucker		Rohprotein in g	Kulturdauer in Tagen
	Pilztrockensubstanz in g	Rohfett in g		
<i>Trichosporon</i> (Molke) .....	47,6	12,4	7,6	5
<i>Endomyces</i> (Melasse) ....	37	15,5	—	5
<i>Oospora</i> (Molke) .....	47,9	14,3	—	5

(Tab. 1) im Vergleich mit den von früheren Autoren erreichten Werten bei *Endomyces* (LINDNER, 1922) und *Oospora* (FINK u. Mitarb., 1937).

*Trichosporon* liefert also in bezug auf Wachstumszeit, Trockensubstanz- und Fettausbeute ganz ähnliche Werte wie *Oospora lactis*. Eine Weiterentwicklung auf diesem Gebiet war daher nur von einer Verbesserung der Züchtungstechnik zu erwarten.

Der geeignete Weg um Kulturfläche zu sparen, schien die Verwendung senkrecht hängender Gitter mit einer Maschenweite von etwa  $\frac{1}{4}$  cm<sup>2</sup> zu

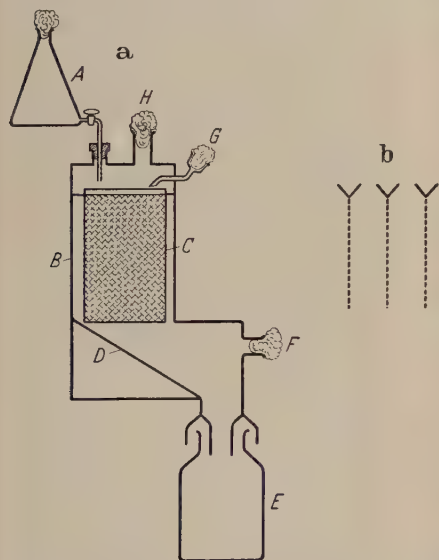


Abb. 1 a und b. Schema der Gitterapparatur. A Vorratsbehälter für die Nährlösung. B Kasten für die Gitterflächen. D Ablaufbahn. E Sammelbehälter. F Luftzufuhr. G Impfstutzen. H Abluft. b Gitter in Seitenansicht mit Impfrinne.



Abb. 2. Gitterapparatur im Modell.

sein. Der Pilz sollte auf der Gitterfläche wachsen, während er von oben mit Nährlösung berieselt wurde. Zur Vermeidung von Infektionen wurden die Gitter in einem geschlossenen, schrankartigen Kasten aufgehängt. Eine Seite des Kastens war als Glastür ausgebildet, um die Gitter beobachten zu können. Die Luftversorgung erfolgte durch Stutzen mit Watteverschluß.

Die danach entwickelte Apparatur (K. L. SCHULZE, 1940) hatte folgenden Aufbau (Abb. 1 u. 2): Im Kolben A befindet sich die Nährlösung. Er ist mit einem Abflußhahn zur Regulierung der Zulaufgeschwindigkeit versehen. Die Nährlösung tropft über eine Verteilerrinne auf die senkrecht hängende Gitterfläche C. Von

diesen Gitterflächen kann man natürlich mehrere nebeneinander aufhängen. Die Impfung geschieht mit einer Aufschwemmung einer Reinzucht des Pilzes durch den Impfstutzen G. Die Aufschwemmung gelangt in die Verteilerrinne, wo auch zunächst das Wachstum beginnt. Durch die zulaufende Nährlösung wird das Material



Abb. 3.



Abb. 4.

Abb. 3. Gitterflächen nach etwa 20 tägigem Betrieb. Der Pilz (*Trichosporon*) hat die ganze Fläche mit einer Decke überzogen. Die Unterschiede zwischen den Zonen sind teilweise erkennbar. Nährlösung: Molke.

Abb. 4. Gitterfläche mit einer Pilzdecke bewachsen. Ein Teil der Pilzmasse hat sich durch das eigene Gewicht abgelöst und ist auf die Ablaufbahn gefallen. Von der Impfrinne aus beginnt neues Wachstum.

in der Folge über die ganze Gitterfläche verteilt, die sich bald mit einer dichten Pilzschicht überzieht (Abb. 3). Die Pilzschicht nimmt im Lauf von einigen Wochen so an Dicke zu, daß sich Teile davon durch ihr eigenes Gewicht vom Gitter lösen (Abb. 4). Sie fallen dann auf die geneigte Ablauffläche D und gleiten darauf zusammen mit der verbrauchten Nährlösung in den Sammelbehälter E. Die freigewordenen Gitterstellen wachsen selbsttätig von haftengebliebenen Pilzresten aus wieder zu. Diese Anordnung hat bemerkenswerte Vorteile gegenüber dem alten Schalenverfahren:



1. Die Kulturflächen hängen senkrecht und sind doppelseitig bewachsen. Man spart dementsprechend an Grund- und Kulturfläche.

2. Der Betrieb ist voll kontinuierlich. Solange Nährlösung zuläuft, wächst die Pilzdecke und fällt selbsttätig aus dem Apparat heraus, im Gegensatz zum Schalenverfahren, wo nach 5 Tagen stets wieder neu angesetzt werden muß.

3. Es ist keine Handarbeit mehr erforderlich, wie etwa bei der Bedienung der Schalen.

Die Laboratoriumsversuche haben erwiesen, daß der eingeschlagene Weg durchaus gangbar war. Allerdings waren eine Reihe von Schwierigkeiten zu überwinden.

1. Das Gittermaterial mußte sehr korrosionsfest sein. Es ließen sich jedoch Kunstharz-Lacke finden, mit denen man auch gewöhnlichen dünnen Eisendraht überziehen und verwenden konnte.

2. Die zulaufende Nährlösung verteilte sich nicht gleichmäßig auf die ganze Fläche. Dieser Fehler würde sich aber bei Großversuchen stark vermindern, da man dann mit entsprechend größeren Zulaufmengen zu rechnen hat, die sich besser verteilen lassen.

3. Die dauernde Sterilhaltung der Apparatur verlangte viel Sorgfalt. Insbesondere mußte die Glastür am Gitterkasten dicht schließen. Durch Filzbeläge ließ sich das zufriedenstellend erreichen.

### *Ergebnisse mit der Apparatur.*

Als erstes zeigte sich, daß schon äußerlich 3 Wachstumszonen zu unterscheiden waren (vgl. Abb. 3):

*Zone I:* Sie entsteht an der Einflußstelle der Nährlösung (im vorliegenden Fall Molke). Der Pilz bildet hier eine feuchte, schwachrosa gefärbte Masse. Es war ersichtlich, daß er hier am schnellsten wuchs, da diese Schicht stets die dickste war. Sie ist von weicher Beschaffenheit, und es lassen sich leicht Teile davon ablösen.

*Zone II:* Sie schloß sich an Zone I an und besaß die größte Ausdehnung unter den 3 Zonen. Sie bestand aus einer weißen, feingefalteten Decke und war von fester Beschaffenheit. Ihre Oberfläche war nicht mehr feucht, sondern trocken. Die Nährlösung floß dementsprechend hier unter der Decke entlang. Offenbar hatten sich in dieser Zone neben anderem auch die Oberflächeneigenschaften der Zellwände geändert, sie waren hydrophob geworden.

*Zone III:* Äußerlich war sie nicht sehr verschieden von Zone II. Sie bestand ebenfalls aus einer gefalteten Decke, aber die Farbe war mehr elfenbein bis gelblich und die Konsistenz mehr schmierig.

Einen tieferen Einblick in die Unterschiede der 3 Zonen gibt die mikroskopische Untersuchung, von der die mikrophotographischen Abbildungen 5a, b, c einen Eindruck vermitteln. Die Pilzmasse der Zone I (Abb. 5a) besteht aus lauter kurzen Fadenstücken, die alle in lebhaftem Wachstum und rascher Teilung begriffen sind. Die Zellen zeigen deutlich ihren embryonalen Charakter. Sie sind sehr zartwandig und ganz von feinkörnigem Protoplasma erfüllt. Vakuolen oder Fettgranula sind nicht



vorhanden. Die Fadenstücke zerfallen offenbar nach der Querwandbildung sofort wieder in ihre Einzelteile, da keine mehrzelligen Fäden zu beobachten sind. Die Zusammensetzung aus lauter freiliegenden kleinen Teilstücken ist die Ursache dafür, daß der Pilz in dieser Phase keine feste Decke bildet, sondern eine weiche Masse.

In der Zone II (Abb. 5b) hat sich die Wuchsform des Pilzes völlig verändert. Es ist ein Geflecht von langen Mycelfäden entstanden, die reines Spitzenwachstum zeigen. Im Plasma sind Vakuolen und die ersten Fettgranula erkennbar. Die Bildung des Mycelgeflechtes gibt die

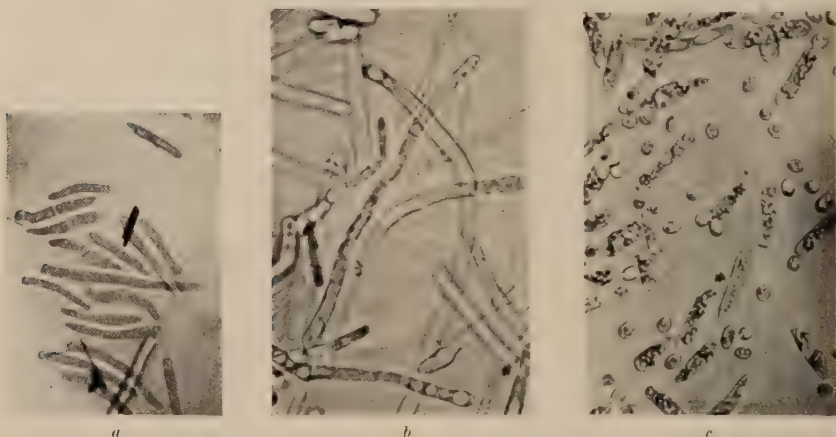


Abb. 5. *Trichosporon* in Gitterflächenkultur. Mikroskopisches Bild aus Zone I (a) II (b) und III (c).

Erklärung für die Entstehung einer festen zusammenhängenden Decke. Außerdem müssen sich, wie bereits betont, die Oberflächen-Eigenschaften der Zellwände geändert haben, da sie sich nicht mehr so leicht benetzen lassen. Im Mikroskop ist nur zu bemerken, daß die Zellwände dicker geworden sind.

In der Zone III (Abb. 5c) sind nur noch wenige Mycelfäden vorhanden. Die Pilzmasse ist fast ausschließlich in längliche Oidien zerfallen, die reichlich Sproßconidien bilden. Diese Erscheinung gibt die Erklärung dafür, daß hier keine feste Decke, sondern eine mehr schmierige Masse vorhanden ist. Bei allen Zellen ist der plasmatische Inhalt verringert. Vakuolen sind nur gelegentlich zu erkennen. Dagegen fallen überall stark lichtbrechende Fett-Tröpfchen auf, die die Zellen oft ganz ausfüllen. Zone III umfaßt also dasjenige Stadium, in dem die eigentliche Fettspeicherung stattfindet.

Ganz ähnliche Beobachtungen machte auch HEIDE (1939) bei *Endomyces vernalis*.

Dieses Ergebnis ist in mehrfacher Hinsicht interessant. Der Vergleich der 3 Zonen ergibt zunächst, daß die Fettspeicherung stets erst in den

späten Stadien des Lebenszyklus einsetzt. Man kann also, ebenso wie bei *Endomyces* (LINDNER) auch bei *Trichosporon* von einer Eiweiß- und einer Fettphase sprechen. Ferner erkennt man, wie sehr die morphologische Entwicklung und die physiologischen Vorgänge bei Pilzen von Außenbedingungen gesteuert werden. Das Auftreten der 3 Zonen ist offensichtlich eine Folge der Veränderungen, die die Nährlösung auf ihrem Wege von oben nach unten durch den Stoffwechsel des Pilzes erleidet. Wohl kann man das Stadium der Zone I als die Jugendform des Pilzes betrachten. Sie ist durch rasches Wachstum und ständige Produktion neuer Zellen gekennzeichnet. Der Pilz verbleibt aber in diesem Stadium, solange frische Nährlösung zufließt. Es ist also nicht so, daß nun aus einer inneren Rhythmik des Organismus heraus das Alters- und Reifestadium folgen müßte. Hierin liegt ein prinzipieller Unterschied gegenüber den höheren Pflanzen und Tieren. Man denke etwa an eine Tomatenkultur in fließender Nährlösung. Bei den höheren Organismen erfolgt der Ablauf der Lebensstadien weitgehend unabhängig von den Außenbedingungen nach einem festliegenden inneren Rhythmus, den man zwar modifizieren kann, aber nicht aufhalten. Die Begriffe Jugend-, Reife- und Altersstadium sind daher bei Pilzen nur in Analogie zu den Verhältnissen bei den höheren Pflanzen verwendbar, sie haben aber nicht denselben Inhalt. Daß z. B. die Wuchsform der Zone I bei *Trichosporon* gewöhnlich nicht zur Beobachtung kommt, liegt nur daran, daß Pilzkulturen in der Regel in ruhenden Nährlösungen oder auf festen Substraten untersucht werden. Dabei wird schon kurze Zeit nach der Beimpfung durch die Stoffaufnahme und -abgabe des Pilzes das Milieu derart verändert, daß das Stadium I rasch vorübergeht und die Mycelbildung einsetzt. Diese zweite Wuchsform und eben o die Oidien- bzw. Sproßconidienbildung ist offenbar viel weniger empfindlich gegen Veränderungen im Substrat, so daß sie langsam abläuft und leichter zur Beobachtung kommt. Die im Normalfall zu beobachtende regelmäßige Abfolge der Lebensstadien wird demnach letzten Endes auch bei den Pilzen durch einen inneren Vorgang, den Stoffwechsel, herbeigeführt. Aber nicht der Stoffwechsel an sich, sondern rückwirkend erst die durch ihn erfolgten Veränderungen im Substrat sind die Ursache für den Übergang von einem Stadium in das andere. Die Wuchsform, in der ein Pilz auftritt, hängt dementsprechend in erster Linie von den jeweils herrschenden Außenbedingungen ab und kann durch sie willkürlich gelenkt werden. Den Beweis dafür liefern die bei unserer Fließkultur gemachten Beobachtungen.

Welche spezielle Änderungen des Substrates jeweils als Ursache wirkt, entzieht sich bis jetzt meist unserer Kenntnis. Es leuchtet ein, daß die Abnahme an assimilierbaren Kohlehydrat-, Stickstoff- und Phosphorverbindungen sowie eine Änderung des  $p_H$ - und  $r_H$ -Wertes dabei eine wichtige Rolle spielen. Es ist aber unwahrscheinlich, daß damit bereits alle auslösenden Faktoren erfaßt sein sollen. Vor allem kommen hier noch die eigenen Stoffwechselprodukte des Pilzes sowie Spuren-

elemente und Wirkstoffe in Frage, deren Einfluß in dieser Richtung bisher kaum untersucht wurde. Die Methode der Kultur in fließender Nährlösung bietet einen aussichtsreichen Weg, um die Entwicklungsphysiologie der Schimmelpilze vollständiger kennen zu lernen als bisher. Hier hat man das, was sich sonst nacheinander abspielt (und unter Umständen sehr rasch nacheinander), nebeneinander vor sich, und kann es in seiner kausal bedingten Abfolge studieren.

Solange Nährlösung zufließt, bleiben bei dem Gitterverfahren die 3 Zonen nebeneinander bestehen. Sie nehmen dabei laufend an Dicke zu. Bei etwa 3 cm Schichtdicke fallen große Teile durch ihr eigenes Gewicht herunter und gleiten auf der Ablaufbahn in das Sammelgefäß. Dementsprechend muß man die Gitter in 10—12 cm Abstand aufhängen, wenn mehrere nebeneinander benutzt werden sollen. Es lösen sich dabei nicht nur reife, fettreiche Decken ab, sondern auch solche aus der Zone I. Das ist ein Nachteil insofern, als dadurch der Gesamtfettgehalt der Ernte etwas gesenkt wird.

Die verwendeten Gitter hatten eine Fläche von  $20 \times 40 \text{ cm} = 0,08 \text{ m}^2$ . Ein derartiges Gitter konnte maximal  $500 \text{ cm}^3$  Molke in 24 Std verarbeiten. Unter Berücksichtigung der bereits genannten Ausbeuten ergeben sich je Flächen- und Zeiteinheit folgende Zahlen:  $1 \text{ m}^2$  Gitterfläche setzt je Tag 6,25 l Molke um, und liefert dabei 125 g Trockensubstanz mit 32,5 g Rohfett.

Nach Umrechnung auf ein geeignetes Bezugssystem kann ein Vergleich mit den bis dahin von früheren Autoren im Schalenverfahren bei den verschiedenen Organismen bzw. Substraten erreichten Höchstwerten durchgeführt werden (Tab. 2).

Tabelle 2. Vergleich zwischen Schalen- und Gitterverfahren.

	Für 1 kg Trocken-Substanz je Tag erforderlich		Für 1 kg Rohfett je Tag erforderlich	
	Fläche in $\text{m}^2$	Nährlösung in Litern	Fläche in $\text{m}^2$	Nährlösung in Litern
Gitterverfahren a) ....	8	50	30,8	195
Schalenverfahren b) ...	16,5	50	c) 65	195

a) *Trichosporon* auf Molke + 0,1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 0,03%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

b) *Endomyces* auf Sulfitablauge (LINDNER).

c) *Oospora* auf Molke (FINK u. Mitarb.).

Der Vergleich ergibt, daß beim Gitterverfahren für die Erzeugung gleicher Mengen an Trockensubstanz bzw. Rohfett nur rund die Hälfte an Fläche gebraucht wird gegenüber dem Schalenverfahren. Die erforderlichen Nährlösungsmengen, und damit wohl auch Kohlehydratmengen, sind dagegen gleich und unabhängig von den jeweils verwendeten Verfahren oder Mikroorganismen. Die Ökonomie des Wachstums und der Fettbildung, der Stoffhaushalt, weist ganz augenscheinlich in allen Fällen eine weitgehende Übereinstimmung auf, ein deutlicher Hinweis darauf, daß wir es hier mit Grundvorgängen der Stoffwechsel-Physiologie zu tun haben. Die Ausnützung der Oberfläche ist dagegen beim Gitter-



verfahren nicht nur rein konstruktiv (senkrechte Anordnung), sondern auch leistungsmäßig erheblich verbessert.

Allgemein betrachtet haben die Oberflächenverfahren gegenüber dem anschließend zu besprechenden Submers-Verfahren in bezug auf den Kraftaufwand einige Vorteile. Es ist bekannt, daß die rasche Umwälzung, Belüftung und Kühlung großer Flüssigkeitsmengen einen bedeutenden Energieaufwand erforderlich macht. Alle diese verteuernenden Faktoren fallen beim Gitterverfahren fort. Andererseits hat es den Nachteil, daß man die Gittereinheiten in der Praxis nicht zu groß wählen darf, da sie sonst unhandlich werden. Für den Umsatz großer Flüssigkeitsmengen wird dadurch auch eine entsprechend hohe Zahl an Gittern erforderlich.

Über den praktischen Wert des Verfahrens läßt sich zur Zeit nichts sagen, da bisher noch keine Erprobung in technischem oder halbttechnischem Maßstab erfolgt ist<sup>1</sup>.

## II. Versuche mit Hefe.

### a) Bisheriger Stand.

Wie im vorhergehenden Abschnitt bereits hervorgehoben wurde, haben die Oberflächenverfahren insbesondere den Nachteil, daß die Verarbeitung sehr großer Flüssigkeitsmengen ganz bedeutende Anlagen erforderlich macht. Der Umsatz von 50000 l Nährlösung (Molke) je Tag, z. B. nach dem Gitterverfahren, würde bereits 800 Gittereinheiten zu je 10 m<sup>2</sup> verlangen. Ein Lüftungsbottich für den gleichen Umsatz ist dagegen ohne Schwierigkeiten herzustellen und unterzubringen.

Es ist daher verständlich, daß man für technische Zwecke immer wieder versuchte, Organismen zu finden, die sich submers kultivieren ließen und dabei reichlich Fett bildeten. Alle Bemühungen, gerade die guten Fettbildner wie *Endomyces* und *Oospora* in belüfteten Nährlösungen zu züchten, schlugen jedoch zunächst fehl [LINDNER, NADSON u. KONOKOTINA (1924). FINK u. Mitarb., HEIDE]. Es hatte sich dadurch die Vorstellung entwickelt, daß fettbildende Mycelpilze allgemein ungeeignet für die submerse Züchtung seien. Diese Vorstellung ist offenbar nicht zutreffend. Durch die Arbeiten von DAMM (1943) sowie BERNHAUER, NIETHAMMER u. RAUCH (1948) wurde bewiesen, daß sich z. B. *Fusarium*-, *Mucor*-, *Rhizopus*- und *Mortierella*-Arten, ja sogar *Endomyces vernalis*, sehr wohl in submerser Form bei kräftiger Verfettung züchten lassen. Jedoch zeigten die Experimente auch, daß Mycelpilze für technische Zwecke einige Nachteile gegenüber der Hefe besitzen: Die Mycelien sind gegen mechanische Beschädigung, z. B. durch Rühren, weit empfindlicher. Höhere Zelldichten, als 14—15 g Trockensubstanz pro Liter Nährlösung entspricht, waren nicht erreichbar. Die Kulturen haben dabei bereits eine musartige Beschaffenheit und sind mit einem Bausch flüssigkeitsgetränkter Watte zu vergleichen. Die Ursache für die Begrenzung der Zelldichte liegt wahrscheinlich darin, daß die Nährlösung in dem engen Geflecht der Hyphen festgehalten wird und kein genügender Austausch mehr stattfinden kann. Ebenso ist anzunehmen, daß auch die Sauerstoffversorgung behindert wird. Bei Hefen lassen sich dagegen

<sup>1</sup> 1941 wurde am Institut für Gärungsgewerbe, Berlin, ein halbttechnisches Modell der in Abb. 2 dargestellten Anlage aufgestellt. Die Arbeitsbedingungen waren jedoch unter den damaligen Verhältnissen so ungünstig, daß es nicht in Betrieb genommen werden konnte.



Populationsdichten entsprechend 25 g Trockensubstanz je Liter Nährlösung ohne besondere Schwierigkeiten erreichen. Dazu kommt, daß z. B. *Fusarium* nach DAMM in Sulfitablaugung nicht kultiviert werden konnte.

Für Hefen ist nun im Gegensatz zu den Mycelpilzen die submerse Züchtung in belüfteten Nährlösungen seit langem das gegebene Verfahren. Hier war es nicht die Kulturmethode, sondern die Fettbildung, die Schwierigkeiten bereitete. Schon LINDNER [1] (1917) hatte auf diesem Gebiet zahlreiche Experimente angestellt. Den Ausgangspunkt bildeten Beobachtungen bei der Anlage von Tröpfchenkulturen. Dabei zeigte sich, daß sowohl Preß- wie auch Wuchshefe (*T. utilis*) zu einer gesteigerten Fettbildung fähig war, wenn folgende Bedingungen eingehalten wurden:

1. reichliche Versorgung mit einer assimilierbaren C-Quelle (Zucker),
2. Abwesenheit bzw. Mangel an assimilierbarem Stickstoff,
3. gute Sauerstoffversorgung.

Das sind die gleichen Bedingungen, die sich auch für die Fettbildung bei deckenbildenden Mycelpilzen, wie z. B. *Endomyces* oder *Oospora*, als entscheidend erwiesen hatten. Besonders die Wirksamkeit des N-Mangels ist dann durch die neueren Arbeiten von STEINER (1941), HEIDE (1939) und RAAF (1941) für Mycelpilze und Hefen eingehend bewiesen worden. Dazu kam aber noch eine vierte Bedingung, nämlich die einer dünnen Aussaat. Lagen die Zellen zu dicht (z. B. bei Wuchshefe mehr als 2 g Trockensubstanz pro Liter), so trat keine Sprossung und Fettspeicherung ein, sondern Gärung. Der technische Wert dieser „Zuckermastmethode“ war daher gering, da sich zu niedrige Ausbeuten ergaben. Selbst wenn das nicht der Fall gewesen wäre, so ist bei diesem Verfahren noch zu berücksichtigen, daß hier die „Fetthefer“ erst in zweiter Stufe erzeugt wird. Zunächst muß in einem vorgeschalteten Arbeitsgang normale Eiweißhefe gewonnen werden, die dann als Stellhefe für den Verfettungsprozeß dient. Auf dem Endprodukt ruht daher ein doppelter Aufwand an Zeit und Kosten.

Diese Fehlschläge bei der submersen Fetthefer-Züchtung waren wohl die Ursache dafür, daß LINDNER [2] (1917) Verfahren ausarbeitete, um nun umgekehrt submers wachsende Hefen zur Oberflächenkultur zu zwingen. Aber auch diese Verfahren sind technisch bedeutungslos geblieben. Trotzdem gebührt ihm das Verdienst, als Erster im Stickstoffmangel einen Weg gezeigt zu haben, um Hefen der verschiedensten Art submers und mit Sicherheit zur Verfettung zu bringen. Allerdings genügte das allein noch nicht, um zu einem technisch brauchbaren Verfahren zu kommen.

Durch die anfänglichen Erfolge mit *Endomyces* war man dann lange Zeit von dem Hefeproblem abgelenkt worden. Erst während des letzten Krieges wurde von neuem an mehreren Stellen versucht, die Frage einer Lösung näher zu bringen. Hier sind vor allem die Arbeiten von RIPPEL-BALDES u. Mitarb. (1943, 1948) sowie von NILSSON u. Mitarb. (1943) zu nennen.

Als Versuchsobjekt benutzten NILSSON u. Mitarb. *Rhodotorula glutinis*, die in synthetischen Nährlösungen mit Invert-Zucker als C-Quelle gezüchtet wurde. Die Kultur erfolgte ähnlich wie bei Preßhefe in belüfteten Zylindern nach dem Zulauf-Verfahren. Das pH wurde zwischen 4,0 und 4,7 gehalten. Die Züchtungsdauer betrug 3–4 Tage, der maximale Fettgehalt 25–30% bezogen auf Trockensubstanz. Die Ausbeuten an Trockenhefe, bezogen auf verbrauchten Zucker (ökonomischer Koeffizient), bewegten sich zwischen 31–36%. Der Fettkoeffizient (= Ausbeute an Rohfett in Gramm bezogen auf 100 g verbrauchte C-Quelle, RIPPEL-BALDES, 1940) betrug 9–11%. Einer praktischen Anwendung des Verfahrens stehen vor allem 2 Hinderungsgründe im Wege: Erstens ist nicht bekannt, wie sich die betreffende Hefeart gegenüber den in der Technik anfallenden Kohlehydratlösungen, wie Sulfitablaugen und Holzzuckerwürzen verhält. Zweitens besitzt *Rhodotorula glutinis*

einen beträchtlichen Wirkstoffbedarf. Um gutes Gedeihen der Kulturen zu erhalten, mußten den Nährlösungen etwa 2,5% an Weizenstroh- oder Malzextrakt zugefügt werden. Bei den großen Umsätzen an Lösungen, die in der Technik zu bewältigen sind (z. B. 500—1000 m<sup>3</sup> Sulfitablauge pro Tag), stellen derartige Wirkstoffzusätze bereits eine starke wirtschaftliche Belastung dar.

RIPPEL-BALDES u. Mitarb. verwendeten für ihre Untersuchungen *Candida (Nectaromycetes) Reukaufii*, eine Hefeart, die häufig in den Nektarien von z. B. *Labiaten* vorkommt. Die Züchtung erfolgte in belüfteten KLUYVERKolben mit Holzzuckerwürzen (BERGIUS) als Nährlösung. Auch hier war es erforderlich, den Würzen Extrakte von Weizenkleie, Malzkeimlingen, Luzerne oder Molken zuzusetzen, und zwar in Mengen von 1—3%. Die Züchtungsdauer betrug 2—3 Tage, allerdings bei sehr geringer Impfmenge.

In Übereinstimmung mit den Befunden früherer Autoren war das Angebot an Stickstoff von entscheidender Bedeutung für die Fettbildung. Mit zunehmendem N-Mangel stieg auch der Fettgehalt. Ferner wurde in einer eigenen Versuchsreihe der Einfluß der Lüftung auf Ausbeute und Fettbildung genauer untersucht. Dabei zeigte sich in Bestätigung der bereits von NAEGELI u. LOEW (1878, 1880) sowie von LINDNER geäußerten Ansicht, daß eine verbesserte Belüftung in der Tat eine gesteigerte Fettausbeute ergibt. Dies ist jedoch weniger auf eine Erhöhung des Fettgehaltes als vielmehr auf eine Steigerung des ökonomischen Koeffizienten, also der Ausbeute an Hefetrockensubstanz, zurückzuführen. Der ökonomische Koeffizient stieg bei starker Belüftung auf fast das Doppelte gegenüber sehr schwacher Belüftung. Hier liegen demnach prinzipiell die gleichen Verhältnisse vor, wie bei der Preß- und Eiweißhefezüchtung. Die Erscheinung steht offenbar im Zusammenhang mit der bekannten PASTEUR-Reaktion. Wie MEYERHOF (1925) zeigte, tritt bei bestimmten Hefen (z. B. *Torulopsis utilis*) mit zunehmender Intensität der Belüftung der Gärungsstoffwechsel stark zurück zugunsten der Atmung und umgekehrt. Die Atmung ist aber in bezug auf die Zellsynthesen weitaus ergiebiger, da bei der Gärung der überwiegende Teil des aufgenommenen Kohlenstoffes in Form von Stoffwechselprodukten verloren geht. Es liegt nahe, anzunehmen, daß bei den fettbildenden Hefen ebenfalls eine derartige Umsteuerung des Stoffwechsels stattfindet, daß sie also zum Typ der „Atmungshefen“ gehören.

Die erreichten Fettgehalte bewegten sich zwischen 28 und 37%. Für den ökonomischen Koeffizienten wurden mehrfach Werte von 42—45 und für den Fettkoeffizienten solche von 12—15 gemessen. Auch die in technischer Hinsicht interessierenden praktischen Ausbeuten sind mit 35—38% für die Hefetrockensubstanz und 12—14% für das Rohfett als günstig zu betrachten. Als praktische Ausbeuten sollen hier die Werte bezeichnet werden, die auf eingesetzten oder angewandten Zucker bezogen sind. Bei den oben genannten Werten muß allerdings berücksichtigt werden, daß sie wahrscheinlich etwas zu hoch gefunden wurden, da infolge der Extrakt- bzw. Molkenzusätze die Menge der jeweils assimilierten C-Quellen nicht ganz genau bekannt ist. Hierauf haben die Autoren selbst hingewiesen.

Trotz der günstigen Ausbeuten stehen auch der Anwendung der *Candida Reukaufii* für technische Zwecke einige Hinderungsgründe entgegen. Ihr Verhalten gegen Sulfitablauge, die einen der Hauptrohstoffe für die Hefeherzeugung darstellt, ist nicht bekannt<sup>1</sup>. Ferner bedeutet der beträchtliche Wirkstoffzusatz, ebenso wie bei den Versuchen von NILSSON u. Mitarb., eine gewisse wirtschaftliche Belastung. Eine weitere Schwierigkeit liegt in dem Erfordernis der Reinkultur. In technischem Maßstab ist es in der Hefeindustrie bis heute nicht möglich, in absoluter Reinkultur zu arbeiten. Die für Brauereizwecke konstruierten Apparaturen sollen hier außer Betracht bleiben, da sie lediglich zur Gewinnung der Stellhefe dienen und mithin

<sup>1</sup> Allerdings vermag dieser Organismus Pentosen zu verarbeiten.

nur verhältnismäßig kleine Hefemengen erzeugen. Die Backhefeindustrie stellt allerdings nach dem langjährig erprobten Zulauf-Verfahren (CLAASSEN, 1935) ein weitgehend einheitliches Produkt her. Das ist jedoch nur dadurch möglich, daß nach wenigen Führungen immer wieder frische Stellhefe benutzt wird, die man aus Laboratoriums-Reinkulturen in mehreren Stufen herführt. In der gleichen Weise könnte man wohl auch *Candida Reukaufii* züchten. Nun ist man aber in neuerer Zeit, da wo es nicht darauf ankommt, Backhefe, sondern Futter- bzw. Nährhefe herzustellen, in steigendem Maß zu den vollkontinuierlichen Verfahren übergegangen (SEIDEL, 1941). Dabei wird unter stetem Zu- und Ablauf der Nährlösung mit einem Ansatz oft wochen- und monatelang gearbeitet. Eine Reinkultur ist natürlich unter diesen Umständen noch weniger möglich als beim Zulaufverfahren.

#### *b) Eigene Versuche nach dem kontinuierlichen Verfahren.*

Die kontinuierliche Arbeitsweise stellt eine Weiterentwicklung des Zulaufverfahrens dar. Dort wird bekanntlich die Lüftungsbütte zunächst mit einem Teil, z. B.  $\frac{1}{8}$ , der zu verarbeitenden Nährlösung angestellt. Ist der Verhefungsprozeß in Gang gekommen, so läßt man die restliche, vorbereitete Lösung nach Maßgabe des Zuckerverbrauches unter Rührung und Lüftung zufließen. Man richtet den Vorgang so ein, daß nach 8—10 Std die Bütte gefüllt und der Zucker verbraucht ist. Dann wird die gesamte Maische aufgearbeitet und mit einem Teil der Erntehefe oder auch mit frischer Reinzuchthefer ein neuer Ansatz gemacht. Die Weiterentwicklung besteht nun darin, daß man nach Füllung der Bütte ihren Inhalt nicht aufarbeitet, sondern den Zulauf und die Belüftung fortsetzt und gleichzeitig soviel hefehaltige Maische abzieht, als dem Zulauf entspricht. Die Bütte bleibt somit stets in gleicher Höhe gefüllt. Die Zulaufmenge wird so bemessen, daß ein bestimmter Restzuckergehalt der Maische (z. B. 0,2—0,5%) nicht überschritten wird. Dann stellt sich ein Gleichgewicht ein, wobei ebensoviel Hefe neu zuwächst wie im Ablauf abgezogen wird. Aus dem Verhältnis der Zulaufmenge zum Bütteninhalt berechnet sich die sogenannte Umsatzzeit. So ergibt z. B. 200 l Zulauf je Stunde bei einem Bütteninhalt von 1000 l eine Umsatzzeit von 5 Std. Diese Zahl stellt einen Kennwert dar, der für eine gegebene Hefeart, Apparatur und Nährlösung charakteristisch ist. Er besagt zunächst, daß der Bütteninhalt in 5 Std einmal umgesetzt worden ist. Da aber die Hefemenge in der Bütte dabei praktisch gleich bleibt (richtige Arbeit vorausgesetzt), so bedeutet sie auch, daß in dieser Zeit die in der Bütte vorhandene Hefemenge sich verdoppelt haben muß. Die Umsatzzeit kann daher mit der statistischen Generationsdauer gleichgesetzt werden, d. h. jenem durchschnittlichen Zeitraum, in dem eine Zelle eine gleich große Tochterzelle hervorgebracht hat.

Es leuchtet ein, daß diese Arbeitsweise gegenüber dem Zulaufverfahren große Vorteile bietet: Der Produktionsprozeß bleibt ununterbrochen im Gang, solange Zulauf gegeben, und solange nicht durch eine Betriebsstörung eine Unterbrechung nötig wird. Demzufolge hat sich das kontinuierliche Verfahren weitgehend durchgesetzt, zumal es mit seiner Hilfe gelang, auch die pentosenreiche Buchensulfitablauge zur Eiweißhefeproduktion auszunützen. Damit war eine sehr große und billige Kohlehydratquelle für mikrobiologische Synthesen zugänglich geworden.

Die eigenen Arbeiten auf diesem Gebiet hatten das Ziel, in gleicher Weise nicht nur Eiweiß- sondern auch Fetthefe in kontinuierlichem Vorgang und in technischem Maßstab aus Buchensulfitablauge zu gewinnen (K. L. SCHULZE, 1941). Es erschien zunächst sehr zweifelhaft, ob diese



Aufgabe lösbar sein würde. Fettspeicherung und Wachstum stehen, wie mehrfach belegt, in einem gewissen antagonistischen Verhältnis zueinander. Bei den unter hoher Wachstumsgeschwindigkeit erzeugten Eiweißhefen wird stets nur ein geringer Fettgehalt von 3—5% gefunden. Für die Durchführung einer kontinuierlichen Hefezüchtung war jedoch Vorbedingung, daß die verwendeten Hefen gleichzeitig Fett speicherten und sich vermehrten. Andernfalls würde die Hefemenge in der Bütte ständig abnehmen, da ja laufend ebensoviel Maische entnommen wird, wie frische Nährlösung zufließt. Ferner ist bereits hervorgehoben worden, daß die derzeitigen technischen Anlagen die Erzeugung einer Reinzuchtheife nicht gestatten.

Es stellte sich heraus, daß das Ziel trotzdem erreichbar war, und zwar auf dem Wege einer Stoffwechselsteuerung durch die Phosphatversorgung. Bisher hatte man stets nach dem Vorbilde LINDNERS Stickstoffmangel benutzt, um die Fettspeicherung herbeizuführen. Es gibt jedoch noch einen zweiten Weg hierfür, der wirksamer ist, und zwar Phosphatmangel. Die kontinuierliche Hefezüchtung in Sulfitablauge bietet eine gute Möglichkeit, den Phosphatstoffwechsel dieser Organismen zu untersuchen, da die Ablaugen sehr phosphatarm sind. Sie enthalten nur 20—40 mg  $P_2O_5$  im Liter. Diese Menge reicht bei weitem nicht aus, um den Bedarf der Hefe zu decken. Normalerweise wird so viel Phosphat zugegeben, daß 700—800 mg  $P_2O_5$ /l Zulauf vorhanden sind. Kultiviert man nun Hefen der verschiedensten Art unter Verwendung einer Abauge, die alle erforderlichen Zusätze, wie Ammoniak, KCl und  $Mg SO_4$ , mit Ausnahme von Phosphat enthält, so kann man feststellen, daß die Zellen zunehmend an Phosphat verarmen. Das macht sich zunächst dadurch bemerkbar, daß die gebotenen Kohlenhydrate immer langsamer verarbeitet werden; der Restzucker steigt an. Man muß die „Belastung“, d. h. die Zulaufmenge je Zeiteinheit immer mehr verringern. Die Umsatzzeit bzw. die Generationsdauer  $G$  wird also immer länger. Das zeigt sich auch im mikroskopischen Bild (vgl. Abb. 9a, b): Die Zellen stellen in zunehmendem Maß ihre Sproßtätigkeit ein. Gleichzeitig aber verarmen sie an Eiweiß und nehmen dafür im Fettgehalt zu. Es dauert längere Zeit, bis sich dieser Zustand einstellt, da zunächst der Phosphat-Vorrat, den die Ausgangshefe enthält, auf die Tochterzellen verteilt wird. Gute Belüftung ist dabei erforderlich. Fügt man zu einer derartigen phosphatarmen Kultur Phosphorsäure oder ein Phosphorsalz, so beginnt sofort der Zuckergehalt der Maische zu sinken. Die Fettgranula in den Zellen nehmen zusehends ab und schon nach 2 Std setzt eine ungewöhnlich lebhaftes Sprossung ein. Man kann infolgedessen die Belastung erhöhen, bis wieder der Ausgangszustand erreicht ist. Diese Vorgänge laufen mit der Sicherheit eines Vorlesungsversuchs ab. Sie beweisen, daß es durch Phosphatmangel möglich ist, Hefe zur gesteigerten Fettbildung zu veranlassen.



Normale Eiweißhefe enthält durchschnittlich 4%  $P_2O_5$  in der Trockensubstanz, verfettete Hefe dagegen nur 0,6—1%, d. h. 15—20% des Normalen. Die Unterschiede lassen sich am Vergleich der Analysenzahlen für eine typische Eiweiß- und Fetthefe am deutlichsten erkennen (Tab. 3).

Tabelle 3. *Vergleich zwischen Eiweiß- und Fetthefe.*  
(Alle Zahlen in % der Trockensubstanz.)

	Rohfett	Rohprotein	$P_2O_5$	Asche	Summe Fett u. Eiweiß
Eiweißhefe .....	4,8	49,3	3,8	8,2	54,1
Fetthefe .....	19,5	33,2	0,8	4,3	52,7

Beide Hefen wurden im kontinuierlichen Verfahren auf Sulfitablauge gezüchtet. Die Fetthefe ist demnach dadurch charakterisiert, daß neben dem Phosphatgehalt auch der Aschengehalt erniedrigt ist. Ferner ist ihr Eiweißgehalt etwa in dem gleichen Maß gesunken, wie der Fettgehalt anstieg. Die Summe beider Zellbestandteile beträgt etwas über 50%.

Um einen genaueren Einblick in die physiologische Wirkung des Phosphatmangels zu bekommen, wurde so vorgegangen, daß das Phosphat in Form einer 0,2%igen Diammonphosphatlösung gesondert neben dem Kohlenhydratzulauf gegeben wurde. So bestand die Möglichkeit, die Phosphatdosis stufenweise beliebig zu steigern und dabei deren Einfluß auf die Generationsdauer, das Restphosphat in der Maische und die Zusammensetzung der Hefe zu prüfen. Da Diammonphosphat verwendet wurde, nahm mit steigender P-Gabe auch die zugefügte N-Menge zu und umgekehrt. Jedoch war durch eine Grundgabe von 28 g N als Ammoniak pro Kilogramm reduzierender Substanz dafür gesorgt, daß N nicht als Minimumfaktor auftreten konnte. Alle übrigen Faktoren wie Zuckergehalt, Nährsalze und pH-Wert des Zulaufs sowie Belüftung, pH-Wert, Temperatur und Restzuckergehalt der Maische wurden soweit als möglich konstant gehalten. Das war bei der Vielzahl zu kontrollierender Faktoren aus zeitbedingten Gründen<sup>1</sup> nur angenähert erreichbar. Die erhaltenen Werte streuen daher beträchtlich. Die verwendete Hefe war eine an Sulfitablauge angepaßte Industriehefe. Als Apparatur diente eine kleine Modellbütte aus nichtrostendem Stahl bei der die Belüftung durch rasch rotierende Belüftungsrohre erfolgte, ähnlich den in der Industrie verwendeten Konstruktionen (vgl. PRESCOTT u. DUNN, 1949, Abb. 40). Das Restphosphat wurde laufend nach einer modifizierten colorimetrischen Methode mit dem LANGE-Colorimeter bestimmt (LOHMANN und JENDRASSIK, 1926). Die Ergebnisse sind in den Tab. 4 und 5 sowie den Abb. 6, 7 und 8 dargestellt.

<sup>1</sup> Mangel an Personal und Regelgeräten.

Tabelle 4. Beziehungen zwischen Phosphatdosis, Umsatzzeit und Restphosphat.

Relative Phosphatdosis*)	Restphosphat in mg $P_2O_5$ /l Maische	$P_2O_5$ in % der Hefe-Tr.-S.	Umsatzzeit $G$ (= Generationsdauer in Std)	Reziproke Umsatzzeit: $\left(v = \frac{24}{G}\right)$
1	8—20	0,48—0,6	42—165	0,57—0,14
2,5	8—20	0,5 —0,7	20	1,2
10	8—20	—	9,3	2,58
12	8—20	—	13,3	1,8
15	8—20	—	9,4	1,8
15	8—20	—	9,4	2,55
25	8—20	—	8,9	2,7
31	8—20	—	7,9—8,2	2,9—3,04
40	8—20	—	7,5	3,2
56	8—20	—	7,1	3,38
78	25—80	5,2	7,1	3,38
100	132—480	5,2	7,1	3,38

\* Die Angabe erfolgt in % der Maximaldosis von 18 cm<sup>3</sup>/min.

#### Versuchsdaten:

Zulauf: Buchensulfitablauge, Reduz. Substanz nach FEHLING 3,0—3,5%.

Nährsalze: 28 g N als Ammoniak, 15 g KCl je 1 kg red. Subst. pH nach Salzgabe: 4,2—4,3.

Phosphatgabe: 0—18 cm<sup>3</sup>/min als 0,2% ige Diammonphosphatlösung.

Belüftung: etwa 180 l Luft/Std.

Bütteneinhalt: 6—8 l.

Maische pH = 5,0—5,5. Restzucker: 0,4—0,6%.

P-Bestimmung in der Hefe gravimetrisch.

Die Umsatzzeiten stellen Durchschnittswerte dar aus jeweils mehrere Tage dauernden Versuchen. Die gesamte Versuchsdauer betrug über 4 Wochen.

Aus Tab. 4 und Abb. 6 geht zunächst ein eigenartiges Verhalten des Restphosphats hervor. Bis zu einer P-Dosis von 56% bleibt es bei 8—20 mg  $P_2O_5$ /l enthefte Maische. Erst von da ab beginnt in rasch steigenden Mengen Restphosphat aufzutreten. Daraus muß man schließen, daß bis zu einer bestimmten „Sättigungsgrenze“ das ständig zulaufende Phosphat praktisch sofort in den Hefezellen verschwindet. Der Phosphatgehalt der Hefe wurde zwar nur bei den beiden niedrigsten und höchsten Phosphatgaben bestimmt. Jedoch geht aus dem durchschnittlich gleichbleibenden niedrigen Restphosphat hervor, daß bis zu 56% Phosphatdosis die zugegebene Menge praktisch vollständig aufgenommen wurde. Demnach ist der Phosphatgehalt der Hefe von 0,5% bis auf 5,2% etwa proportional der zunehmenden Dosis gestiegen, um von da ab trotz steigender Phosphatgabe auf gleicher Höhe zu bleiben. Die „Sättigungsgrenze“ für Phosphat liegt also in unserem Fall bei 5,2%  $P_2O_5$  bezogen auf Trockensubstanz. Mehr Phosphat nimmt die

Zelle nicht auf, selbst wenn es ihr im Überschuß geboten wird. Der Überschuß erscheint vielmehr als steigendes Restphosphat in der Maische. Liegt der P-Gehalt der Zelle dagegen unterhalb der Sättigungsgrenze, so wird das von außen gebotene Phosphat rasch aufgenommen und zwar gegen ein erstaunlich hohes Konzentrationsgefälle. Bei 56% Phosphatdosis werden der Maische rund 108 mg  $P_2O_5$  je min zugeführt. Dabei werden als Restphosphat nur durchschnittlich 14 mg  $P_2O_5$  je l hefefreie Maische festgestellt (vgl. Abb. 6). Die zugeführte P-Menge verschwindet also praktisch sofort in den Hefezellen, obwohl diese zu gleicher Zeit

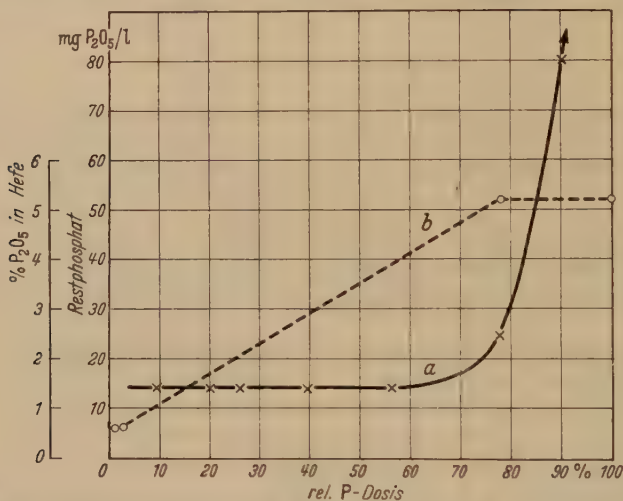


Abb. 6. Beziehungen zwischen Phosphatdosis, Restphosphat (a) und Phosphatgehalt der Hefe (b).

rund 4%  $P_2O_5$  in der Trockensubstanz enthalten. Setzt man das spezifische Gewicht der Hefezelle = 1,108, so betragen 100 g reine Hefezellmasse = 90,4 cm<sup>3</sup>. Die 100 g Zellmasse entsprechen etwa 30 g Trockensubstanz<sup>1</sup> = 1200 mg  $P_2O_5$  bei 4%  $P_2O_5$ -Gehalt. Die P-Konzentration der lebenden Hefezellmasse ergibt sich danach zu 1330 mg  $P_2O_5$ /100 cm<sup>3</sup> Zellmasse. Sie liegt rund um das 1000fache höher als diejenige in der Außenlösung. Wenn die Zellen trotzdem das Phosphat bis zu der hier gezeigten Sättigungsgrenze aufnehmen, so läßt das darauf schließen, daß es nach der Aufnahme sofort in organische Bindung übergeht und indiffusibel wird. Die Menge an freiem anorganischem Phosphat im Zellinnern ist offenbar sehr gering, da erst bei durchschnittlich 14 mg Restphosphat pro Liter Außenlösung ein Gleichgewicht erreicht wurde. Obwohl eine einwandfreie Bestimmung der Phosphatverteilung in lebender Hefe sehr schwierig ist, deuten die analytischen Befunde verschied-

<sup>1</sup> Nach eigenen Messungen.

dener Untersucher in die gleiche Richtung (vgl. LYNEN, 1940). Danach liegt das in den Hefezellen vorhandene Phosphat zum größten Teil in organischer Bindung vor.

Nicht in Übereinstimmung damit stehen dagegen die Ansichten mehrerer Autoren über die Permeabilität des Phosphats. So soll nach HEVESY, LINDERSTRÖM-LANG und NIELSEN (1937) sowie MACFARLANE (1939) Brauereihefe für anorganisches Phosphat fast völlig impermeabel sein, jedenfalls solange es sich um ruhende Zellen handelt. F. LYNEN (1940, 1942) faßt daher die Hefezelle in bezug auf das Phosphat als ein praktisch völlig geschlossenes System auf. Dagegen wandte sich bereits MALM (1941), der nachwies, daß frische Bäckerhefe stets anorganisches Phosphat aus der Außenlösung aufnimmt. Nur bei verarmter Hefe und bei sehr niedrigen P-Konzentrationen war keine Aufnahme feststellbar. Die Ursache für diese Differenzen liegen offenbar darin, daß jeweils verschiedene physiologische Bedingungen und verschiedene Hefen vorgelegen haben.

Aus den obigen Versuchen geht jedenfalls eindeutig hervor, daß die aerob wachsende Hefezelle in bezug auf P nicht als ein abgeschlossenes System betrachtet werden kann, sondern eher als ein Phosphatspeicher, der sich nach Möglichkeit bis zu einer Sättigungsgrenze belädt.

Über die Art der P-Aufnahme ist bisher keine Klarheit vorhanden. Hier mündet die Untersuchung in das noch wenig geklärte allgemeine Problem der Stoffaufnahme in die pflanzliche Zelle ein. Am ehesten würden die Beobachtungen zu einer Aufnahme nach Art einer Adsorption passen. Jedoch darf man den Vorgang offenbar nicht als rein physikalisch-chemische Erscheinung auffassen, die sich auch an toten Zellen abspielen würde. Bei den vorliegenden Versuchen wurde mehrmals beobachtet, daß die Phosphataufnahme eng mit der Lebenstätigkeit der Zelle gekoppelt ist. Bei Störungen im Wachstumsprozeß trat nämlich stets erhöhtes Restphosphat auf, das wieder verschwand, wenn die Störung behoben war.

Die Versuche zeigen weiterhin, daß es durch eine geregelte Phosphatzufuhr möglich ist, den  $P_2O_5$ -Gehalt der Hefe willkürlich zwischen den Grenzen von 0,5 und 5,2% zu variieren. Die Hefe kann also eigenartigerweise bei einem im Verhältnis 1 : 10 schwankenden P-Gehalt aerob wachsen. Wohl hat sie das „Bestreben“, Phosphat bis zu einer bestimmten Sättigung aufzunehmen, sie kann jedoch auch bei stark erniedrigten P-Gehalten ihren Stoffwechsel aufrechterhalten und sich vermehren, falls ihr nur wenig Phosphat im Substrat zugänglich ist. Allerdings bleibt dieser P-Mangel nicht ohne tiefgehenden Einfluß auf den gesamten Stoffwechsel. Als erste Erscheinung zeigte sich, wie bereits betont, regelmäßig eine stark verlangsamte Kohlehydratassimilation und in deren Gefolge ein gehemmtes Wachstum. Aus der Tab. 4 ist zu entnehmen, daß die Umsatzzeit, bzw. die Generationsdauer  $G$  mit steigender P-Gabe immer kürzer wurde, d. h. die Verhefungsgeschwindigkeit  $V = \frac{24}{G}$  nahm zu. Die Abb. 7 gibt eine graphische Darstellung dieser Verhältnisse. Auf der X-Achse ist die steigende Phosphatdosis, auf der Y-Achse die Verhefungsgeschwindigkeit eingetragen. Trotz der versuchsbedingten beträchtlichen Streuung der Werte ergibt sich, daß die Verhefungs-



geschwindigkeit mit steigender Phosphatgabe nach Art einer Ertragskurve einem Maximum von 3,38, entsprechend einer Generationsdauer von 7,1 Std, zustrebt. Besonders deutlich wird dabei, daß bei den niedrigsten Phosphatgaben die Wirkung der Steigerung am größten ist. So nimmt bei einer Erhöhung der Phosphatdosis von 2% auf 7% die Verhefungsgeschwindigkeit  $V$  von 1 auf 2 zu, bzw. die Generationsdauer  $G$  verkürzt sich von 24 Std auf 12 Std. Wird die Phosphatdosis von 7 auf 14% erhöht, so steigt  $V$  nur auf 2,5 bzw.  $G$  verkürzt sich auf 9,6 Std. Je näher die Hefe sich der P-Sättigung befindet, desto weniger Wirkung

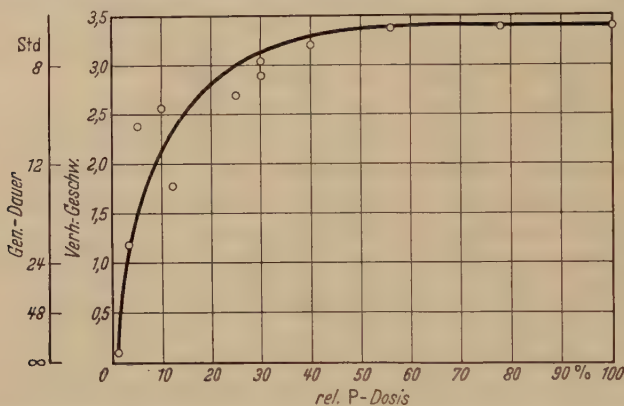


Abb. 7. Beziehung zwischen Phosphatdosis und Verhefungsgeschwindigkeit bzw. Generationsdauer

übt eine Phosphaterhöhung aus, oder desto mehr Phosphat muß aufgewendet werden, um eine Wirkung zu erreichen. Bei 56% Phosphatgabe ist die maximale Verhefungsgeschwindigkeit von 3,38 entsprechend einer Generationsdauer von 7,1 Std erreicht und von da ab wird  $V$  bzw.  $G$  unabhängig von der P-Dosis. Eine Steigerung auf fast das Doppelte bleibt wirkungslos.

Da die steigende Phosphatdosis bis zu 56% Zugabe praktisch vollständig von den Hefezellen aufgenommen wurde, so gibt die X-Achse bis zu diesem Punkt auch steigende Phosphatgehalte der Hefezellen wieder. Es ist hiermit also ein direkter Zusammenhang zwischen der Phosphatkonzentration im Innern der Zelle und der Geschwindigkeit der Zuckerassimilation bzw. des Wachstums und der Zellsubstanzsynthese sichtbar geworden. Besonders deutlich geht das aus der halblogarithmischen graphischen Darstellung in Abb. 8 hervor. Auf der Y-Achse ist die gleiche Skala verwendet wie bei Abb. 7. Auf der X-Achse ist dagegen die Phosphatdosis in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Man erkennt, daß im Anfangsteil der Kurve eine direkte Proportionalität zwischen Phosphatkonzentration der Zelle und der Geschwindigkeit des Stoffwechsels herrscht. Von etwa 15% Phosphatdosis

ab macht sich jedoch bereits eine zunehmende Hemmung bemerkbar. Die ausführliche Untersuchung dieser Verhältnisse soll einer späteren Arbeit vorbehalten bleiben.

In dem gleichen Versuch wurde neben den P-Bestimmungen auch der Eiweiß- und Fettgehalt der geernteten Hefe untersucht. In Tab. 5 sind die Einzelwerte dargestellt. Die Analysen zeigen, daß die bei hohen P-Gaben gezüchteten Hefen Nr. 1—3 stets einen hohen Eiweißgehalt bei Fettgehalten von 4—6% aufweisen. Die in dem gleichen Versuch bei niedrigen P-Gaben geernteten Hefen Nr. 4—7 dagegen haben hohe Fettgehalte von 20 bis 26%. Die von den früheren Untersuchern (HEIDE, RAAF) festgestellte umgekehrte Beziehung zwischen Fett- und Eiweißgehalt tritt auch hier deutlich hervor. Auffällig ist die relativ hohe Summe von Fett- und Eiweißgehalt, die durchweg über 50% der Trockensubstanz beträgt.

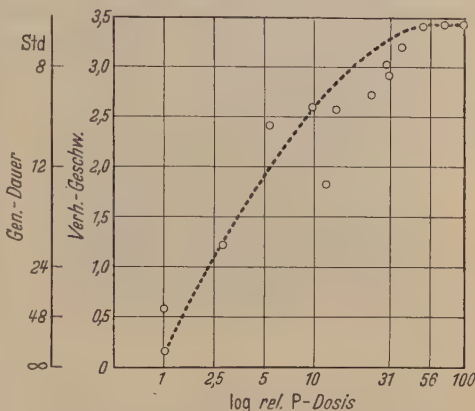


Abb. 8. Beziehung zwischen Phosphatdosis und Verhefungsgeschwindigkeit bzw. Generationsdauer in halblogarithmischer Darstellung.

Die Ausbeute in bezug auf eingesetzte reduzierende Substanz (= praktische Ausbeute der Tabelle) liegt bei 30—40%. Der ökonomische Koeffizient beträgt 39—49%. Das sind Werte, die praktisch durchaus brauchbar sind. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß sie sicher

Tabelle 5. Beziehung zwischen Phosphatdosis und Fettgehalt.

Nr.	Relative Phosphatdosis %	Rohfett in % d. Tr.-S.	Rohprotein in % der Tr.-S.	Summe Fett u. Eiweiß in % d. Tr.-S.	Tr.-Hefe in g/l	Prakt. Ausbeute in %	Ökon. Koeffizient <sup>1</sup>
1	100	4,2	52,8	57	13	38	—
2	100	4,2	52,3	56,5	12,2	36	—
3	56	6,0	45,7	51,7	12,3	36	—
4	2,3	22,6	29,9	52,5	10,0	30	39,2
5	2,3	26,0	28,6	54,6	10,5	31	49,5
6	1,0	20,8	31,2	52,0	14,2	40	(56,6) <sup>2</sup>
7	1,0	24,8	31,9	56,7	11,8	34	49,2

<sup>1</sup> Konventioneller Wert, bezogen auf reduzierende Substanz nach BERTRAND, da bei Sulfittablagen eine exakte Erfassung der assimilierbaren C-Quellen sehr schwierig ist.

<sup>2</sup> Wahrscheinlich Versuchsfehler.

etwas zu hoch liegen, da die Sulfitablaue neben den Kohlehydraten noch ins Gewicht fallende Mengen an Essigsäure enthält (etwa 1%). Die Essigsäure wird ebenfalls assimiliert, wie sich aus der regelmäßigen  $p_H$ -Erhöhung der Maischen ergab.

Bei weiteren ähnlichen Versuchen mit an Sulfitablaue angepaßter Wuchshefe zeigte sich, daß P-Mangel zwar in jedem Fall eine Steigerung des Fettgehaltes zur Folge hatte, aber das Ausmaß dieser Steigerung war sehr unterschiedlich. Hierzu die Zahlen der Tab. 6 aus einem Versuch, bei dem die Hefe im wesentlichen aus *Torulopsis utilis* bestand. Hier sind, trotzdem die  $P_2O_5$ -Gehalte von 3,8 auf 0,62% sanken, doch nur Fettgehalte von 10% erreicht worden.

Tabelle 6. P-Mangel-Versuch bei Wuchshefe.

$P_2O_5$ in % der Tr.-S.	Rohfett in % der Tr.-S.	Rohprotein in % der Tr.-S.
3,8	5,1	48,3
1,7	7,8	46,6
1,1	9,6	30,6
0,9	8,4	34,6
0,71	10,6	36,6
0,62	10,4	34,6

Es war naheliegend, anzunehmen, daß es demnach bei der Fettbildung nicht nur auf den P-Mangel, sondern auch auf die jeweils verwendete Hefeart ankommt.

Dieser Schluß lag umso näher, als auch alle anderen Untersucher seit NÄGELI und LOEW die bei den einzelnen Arten und Stämmen sehr verschieden stark ausgeprägte Neigung zur Fettbildung festgestellt hatten. Das gleiche geht auch aus Versuchen von RAAF hervor, wo *T. utilis* nur 14,4% Fett enthielt, während z. B. bei *Willia anomala* unter den gleichen Bedingungen 16,9% gefunden wurden. SOETERS (1941) sagt zwar in seinem Bericht, *T. utilis* könne nach HÄSELER und FINK (1940) bis zu 50% Fett bilden. Hier liegt aber ein Mißverständnis vor. Bei der in Betracht kommenden Stelle sprechen die genannten Autoren nicht von 52% Fettgehalt, sondern von maximal 52% Trockensubstanzausbeute, die sie bei ihren Versuchen erhalten haben. Auch sonst ist bisher nichts darüber bekannt geworden, daß *T. utilis* 50% Fett bilden könne.

Die Annahme, daß bei der Fettbildung nicht nur die Außenbedingungen sondern auch erblich festgelegte Anlagen entscheidend sind, erwies sich als zutreffend. Es konnten aus Sulfitablaue mehrere Hefestämme isoliert werden, die eine weit stärkere Fähigkeit zur Fettbildung besaßen als *T. utilis*. Bei diesen Isolierungen wurde mit Rücksicht auf die technische Anwendung Wert darauf gelegt, von vornherein nur solche Arten zu verwenden, die fähig waren, in der pentosenreichen Buchenablaue ohne jeden Zusatz von Wirkstoffen oder Aktivatoren zu gedeihen. Eine Bestimmung der einzelnen Arten erfolgte nicht, mit einer Ausnahme, wo

es sich um *Candida tropicalis* handelte. Auf die besondere Eignung der *C. tropicalis* für technische Zwecke und ihr häufiges Vorkommen in industriell erzeugter Hefe hat vor allem S. WINDISCH (1948) hingewiesen.

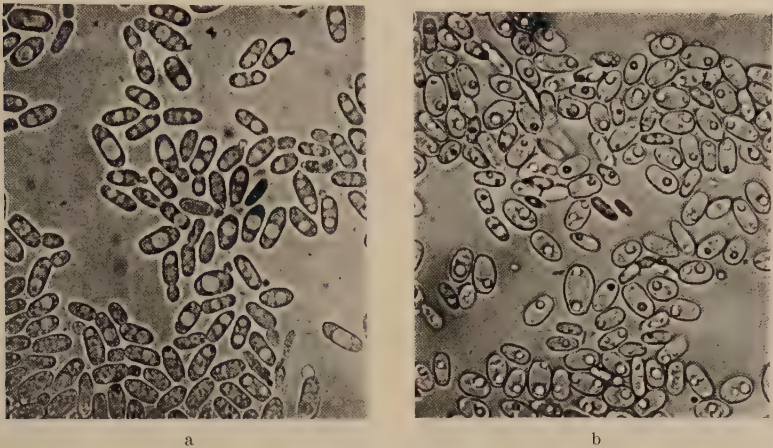


Abb. 9. Hefe in kontinuierlicher aerober Züchtung unter Phosphatmangel. a) Wuchshefe, im wesentlichen *Torulopsis utilis*, bei normaler Züchtung mit voller P-Gabe im Zulauf. Die Zellen sind eiweißreich und sprossen kräftig. b) Die gleiche Hefe unter P-Mangel. Mäßige Fettbildung, sehr geringe Sproßtätigkeit.

Tabelle 7. *Fettheife (Stamm FS 4) bei kontinuierlicher Züchtung unter P-Mangel.*

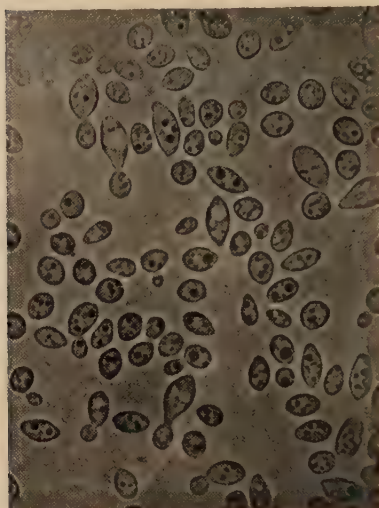
Versuchs- tage	Rohfett in % der Tr.-S.	Rohprotein in % d. Tr.-S.	Summe Fett u. Eiweiß in %	Praktische Aus- beute (bez. auf einges. reduz. Subst. n. BERTRAND)	Umsatzzeit (Generations- dauer) in Std
1	18,0	25,0	43,0	50,5	7,5
2	17,6	30,0	47,6	49,5	11,2
3	16,0	31,0	47,0	51,5	11,2
4	18,0	26,0	44,0	51,5	11,2
5	19,2	26,7	45,9	44,3	12,5
6	24,8	25,6	50,4	37,0	15,0
7	30,3	18,6	48,9	41,6	21,0
8	29,6	18,6	48,2	48,0	22,5
9	30,5	22,3	52,2	44,0	22,5

*Versuchsdaten:*

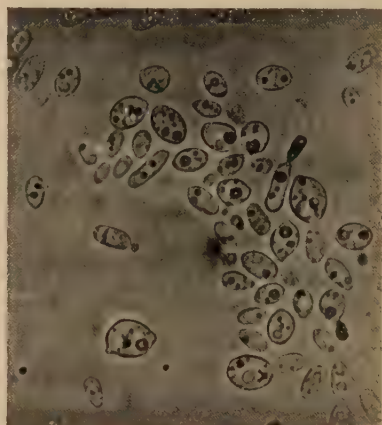
Zulauf: Buchensulfitablauge mit durchschnittlich 3,4% reduzierendem Zucker.  
Phosphatgehalt: 130—190 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/l = 20—25% der Norm, durch Diammon-  
phosphat eingestellt.  
N-Gehalt = 700—800 mg/l durch N aus dem Diammonphosphat + Ammoniak-  
zugabe eingestellt.  
pH = 4,2.  
Bütteneinhalt = 50 l Maische.



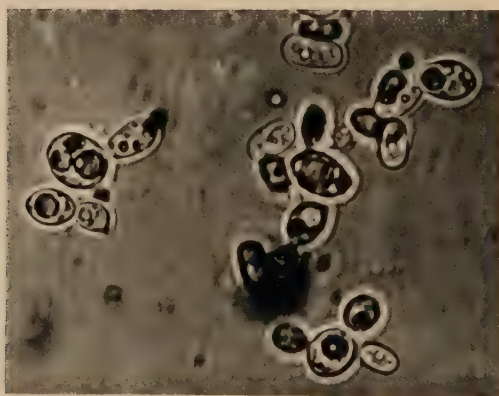
Die Unterschiede, die sich bei der P-Mangelkultur derartiger Stämme gegenüber *T. utilis* ergeben, werden durch die mikrophotographischen Abb. 9a, b und 10a, b, c erläutert. Sie zeigen, daß die Stämme FS 3 und FS 4 bei den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nur stärker Fett bilden, sondern auch besser wachsen.



a



b



c

Abb. 10. Hefestamm FS 4 in aerober Kultur bei P-Mangel. a) Lüftungskultur im KLUYVERkolben mit beginnender Fettbildung. b) Kontinuierliche Züchtung bei P-Mangel. Mittlere Verfettung bei guter Sproßfähigkeit. c) Hefestamm FS 3 unter Phosphatmangel. Starke Fettbildung bei gleichzeitiger Sproßfähigkeit. Alle Züchtungen in Buchensulfitablauge.

In Tab. 7 sind die Ergebnisse eines Versuches mit dem Stamm FS 4 bei kontinuierlicher Züchtung in Buchensulfitablauge unter P-Mangel wiedergegeben.

Aus der Zusammenstellung geht hervor, daß hier über eine Woche lang Hefe mit 18—30% Rohfett erzeugt worden ist. Die Summe von Fett- und Eiweißgehalt beträgt 43—52%. Die praktische Ausbeute bewegt sich zwischen 40 und 50%, wobei deutlich hervortritt, daß sie im Mittel bei den höheren Fettgehalten etwas niedriger liegt. Der Phosphatgehalt der Hefe bewegte sich zwischen 0,9 und 1,1%  $P_2O_5$  bezogen auf Trockensubstanz, d. h. entsprechend der Phosphatgabe im Zulauf bei etwa 25% der Norm. In Parallelität zu den in Tab. 4 sowie Abb. 7 und 8 niedergelegten Befunden ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Fettgehalt und der Generationsdauer erkennbar. Je höher der Fettgehalt steigt, desto mehr verlangsamt sich die Wachstumsgeschwindigkeit. Während bei 18% Fett 8—11 Std für eine Verdoppelung der Hefemenge benötigt werden, sind bei 30% Fett 21—22 Std erforderlich.

Bei diesen Versuchen war es möglich, die Bedeutung der Phosphorsäure als dem entscheidenden Faktor für die Umsteuerung des Stoffwechsels besonders klar zu zeigen. Erhöhte man den P-Gehalt des Zulaufs von 150 mg  $P_2O_5$ /l auf die für Eiweißhefe übliche Norm von 700 bis 800 mg/l, so sank sofort der Fettgehalt, der Eiweißgehalt stieg, und die Umsatzzeit verkürzte sich auf 5—7 Std. Bei Vorhandensein eines geeigneten Stammes kann daher, lediglich durch Veränderung des P-Gehaltes im Zulauf, einmal eine Eiweißhefe und einmal eine Fetthefe erzeugt werden. Ferner wurde mehrmals festgestellt, daß die Erhöhung des Fettgehaltes auch dann erfolgte, wenn genügend assimilierbarer Stickstoff vorhanden war. Die Verminderung der Eiweißsynthese und die Steigerung der Fettbildung kann also sowohl durch N- wie durch P-Mangel herbeigeführt werden, und zwar unabhängig voneinander.

Durch die Versuche war erwiesen, daß es durch dosierte Phosphatzufuhr bei geeigneten Hefestämmen möglich ist, fettreiche Hefe in kontinuierlichem Vorgang aus Sulfitablage zu gewinnen. Eine direkte Übertragung in technische Maßstäbe war aber nicht ohne weiteres durchführbar. Wie bereits betont, ist es bei den derzeitigen Anlagen nicht möglich, das Eindringen unerwünschter Infektionen zu vermeiden. In der Praxis mußte demnach von vornherein darauf verzichtet werden, einen reinen Hefestamm zu züchten. Trotzdem gelang es in den Jahren 1942—44 mehrmals, auch in technischem Ausmaß fettreiche Hefe zu erzeugen. Es stellte sich nämlich heraus, daß dem P-Mangel auch eine Selektionswirkung zukommt in dem Sinne, daß bei genügend langer Einwirkung die fettarmen Wuchshefen zugunsten der Fetthefe zurückgedrängt werden. Man konnte daher zunächst mit einem Ansatz der üblichen Industriehefe beginnen, dem nur eine geringe Menge einer Fett-hefe-Reinkultur beigelegt war. Im Laufe von 3—4 Wochen kontinuier-

licher Züchtung unter P-Mangel verschob sich das Verhältnis der beiden Hefen derart, daß 70—80% des Gemisches aus Fetthefe bestand. Auf diese Weise wurden mehrfach in einer Apparatur mit 6—8000 l Maische-Inhalt und Buchensulfitablauge als Nährlösung folgende Ergebnisse erzielt:

Rohfettgehalt der Hefe:	20—23%
Rohproteingehalt:	25—30%
Ausbeute bezogen auf eingesetzten reduzierenden Zucker:	etwa 40%
Umsatzzeit (= Generationsdauer):	10—12 Std.

Die täglich verarbeitete Ablaugemenge betrug dabei etwa 12000 l, was einer Produktion von etwa 150 kg Trockenhefe je Tag entspricht. In einem einmaligen Versuch mit einer Apparatur von 50000 l Maische-Inhalt wurden in 4 Tagen etwa 3500 kg Trockenhefe mit 12—14% Rohfett erzeugt. Dabei wurden je Tag etwa 90000 l Ablauge verarbeitet. Die Ausbeute betrug 37,7% bezogen auf eingesetzten reduzierenden Zucker bei einer Umsatzzeit von 14 Std.

Damit war erstmals die großtechnische Erzeugung fettreicher Hefe auf submerser Weise und in kontinuierlichem Vorgang durchgeführt worden. Die besonderen Vorzüge des Verfahrens bestehen darin, daß es auf Sulfitablauge anwendbar ist, daß keinerlei Wirkstoffzusätze oder Aktivatoren benötigt werden und daß es dem bei uns herrschenden Phosphatmangel entgegenkommt. Es wird nur  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{5}$  der normalerweise für die Eiweißhefezüchtung erforderlichen Phosphatmengen benötigt. Das Problem der mikrobiologischen Fettgewinnung ist damit prinzipiell gelöst. Die weitere Arbeit wird vor allem in der technischen Durchbildung des Verfahrens zu leisten sein.

### III. Zur Physiologie der Fettbildung.

#### a) Die Wirkung des Phosphatmangels.

STEINER, HEIDE und RAAF waren die ersten, die bei ihren N-Mangelversuchen auf die regelmäßige Gegenläufigkeit zwischen Eiweiß und Fettgehalt hingewiesen haben. Die Feststellung, daß mit einem Steigen des Fettgehaltes stets ein Sinken des Eiweißgehaltes verbunden ist, konnte bei allen daraufhin untersuchten Mikroorganismen bestätigt werden, gleichgültig ob es sich um Hefen oder Schimmelpilze handelte. Nun ist bei N-Mangel als Verfettungsagens an sich zu erwarten, daß eine Verminderung der Eiweißbildung eintritt. Die Phosphatversuche zeigen aber, daß hier tiefere Zusammenhänge bestehen müssen. Denn auch bei P-Mangel trat die gleiche Erniedrigung des Eiweißgehaltes auf, obwohl hier keine direkte Beziehung zum Eiweiß besteht, wie beim Stickstoff.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Auf die Bedeutung des C-N-P-Verhältnisses für die Fettbildung hat soeben DAMM [Cbl. Bakt. I Orig. 155, 337\* (1950)] hingewiesen.

Trägt man die Werte für den Eiweiß- und Fettgehalt der bei den P-Mangelversuchen geernteten Hefen ohne Rücksicht auf die jeweiligen Versuchsbedingungen in ein Koordinatensystem ein, so erhält man die in Abb. 11 wiedergegebene graphische Darstellung. Auf der Y-Achse sind die Rohproteingehalte in % der Trockensubstanz, auf der X-Achse die entsprechenden Rohfettgehalte eingetragen. Die Gegenläufigkeit zwischen Eiweiß- und Fettgehalt ist klar ersichtlich. Darüber hinaus läßt sich zeigen, daß offenbar eine bestimmte Beziehung zwischen den beiden Werten besteht. In das Koordinatensystem ist eine Linie eingetragen, welche alle diejenigen Punkte verbindet, für die die Summe von Fett- und Eiweißgehalt = 50% ist (z. B. 10% Fett + 40% Eiweiß und 40% Fett + 10% Eiweiß). Man sieht,

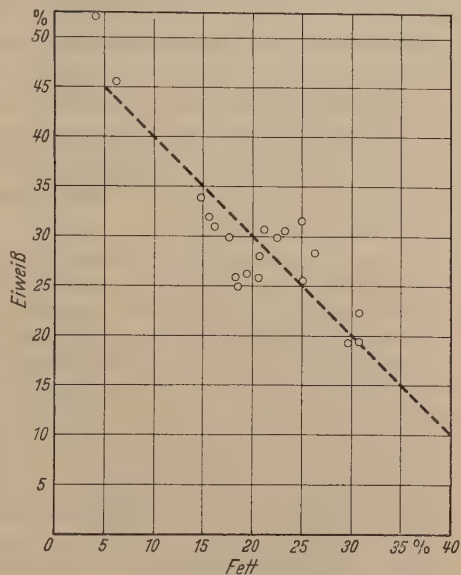


Abb. 11. Beziehung zwischen Eiweiß- und Fettgehalt bei P-Mangelhefe.

daß die experimentell gefundenen Punkte sich verhältnismäßig gut um die Linie einordnen. Prüfen wir daraufhin die bei anderen Objekten gefundenen Werte, so ergibt sich überall prinzipiell das gleiche. In Abb. 12a

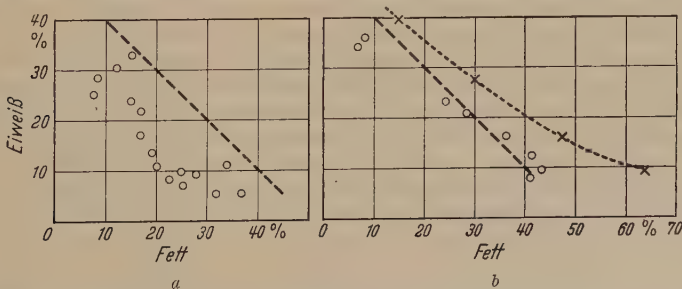


Abb. 12a und b. Beziehung zwischen Eiweiß- und Fettgehalt bei verschiedenen Mikroorganismen. (nach Vers. von RIPPPEL-BALDES, RAAF und BERNHAUER.)  
a = *Candida Reukauffii*; b ○ = *Endomyces vernalis*, × = *Mucor circinelloides*.

und b sind die entsprechenden Kurven wiedergegeben. Jedoch bestehen zwischen den einzelnen Organismen zum Teil ausgeprägte Unterschiede im Summenwert für Fett- und Eiweißgehalt. So liegen die Werte bei *Candida*



*Reukaufii* (Abb. 12a) im allgemeinen beträchtlich unter der 50%-Summenlinie, infolge des ungewöhnlich niedrigen Eiweißgehaltes. *Endomyces ver-nalis* (Abb. 12b) dagegen schließt sich ziemlich genau der genannten Linie an, während *Mucor circinelloides* (BERNHAEUER u. RAUCH, 1948) einheitlich darüber liegt. Es ist möglich, daß hier neben den verschiedenen Versuchsbedingungen auch erblich festgelegte Unterschiede in bezug auf das gegenseitige Verhältnis der Zellkomponenten: Fett, Eiweiß, Asche und Kohlenhydrate zum Ausdruck kommen. Über die Tatsache aber, daß bei allen daraufhin untersuchten Mikroorganismen ein gesetzmäßiger Gegensatz zwischen Eiweiß- und Fettsynthese vorhanden ist, kann kein Zweifel mehr bestehen.

Die alte LINDNERSche Vorstellung von der Eiweiß- und Fettgeneration, die einander im Kulturverlauf bei *Endomyces* ablösen, bedeutet im Grunde genommen dasselbe. Gleichwohl hat sich RAAF in seiner Arbeit gegen diese Vorstellung gewandt. Er verfolgte das Wachstum und die Fettbildung von *Endomyces* in PETRISchalen auf synthetischer Nährlösung nach WÖLTJE, und zwar einmal mit 1% Asparagin als N-Quelle (Reihe A) und einmal mit 0,125%, also  $\frac{1}{8}$  der N-Menge (Reihe B). Es war bekannt, daß in der N-armen Kultur regelmäßig starke Verfettung eintritt. In beiden Reihen erfolgte aber bis etwa zum 9. Tag eine Zunahme sowohl an Trockensubstanz, wie an Gesamtfett und Rohprotein. Daraus schloß RAAF, daß die Trennung in Eiweiß- und Fettphase nicht aufrechterhalten werden könne. Dem muß aber folgendes entgegengehalten werden: LINDNER [3] (1917) hat nicht erklärt, daß in der Fettphase nur noch Fett gebildet wird. Er sagt vielmehr, daß die erste Phase „unter verhältnismäßig starker Stickstoff-Aufnahme“ und „kräftigem Wachstum“ verläuft, und bezeichnete sie als Eiweißgeneration. In der zweiten Phase sollte die Fettspeicherung einsetzen, wobei das Wachstum „nur verhältnismäßig gering“ ist. Daraus geht hervor, daß LINDNERS Begriff „Fettgeneration“ ein gewisses Wachstum nicht ausschließt. Im übrigen war es gerade LINDNERS Entdeckung, daß das Auftreten der Fettphase von dem Mangel an Stickstoff abhängt. „Durch Darbietung einer stickstofffreien Zuckerlösung“ war es ihm gelungen, die zunächst entstandene Eiweißgeneration in eine Fettgeneration umzuwandeln. RAAF hat danach also eigentlich beide Phasen getrennt untersucht und genauer charakterisiert. Das geht besonders daraus hervor, daß in der Reihe A ein über die ganze Versuchsdauer hin gleichbleibender Gehalt von etwa 5% Rohfett und 35% Rohprotein festgestellt wurde. Die Kultur ist demnach stets in der Eiweißphase geblieben. Infolge des hohen N-Gehaltes der Nährlösung ist es gar nicht zu einer Fettspeicherung gekommen. Die Reihe B dagegen kann vielleicht als reine „Fettphase“ betrachtet werden. Bereits bei der ersten Analyse, am 4. Züchtungstag, betrug der Rohfettgehalt 41% und der Rohproteingehalt nur 8—9%. Dieses Verhältnis blieb mit geringen Schwankungen unverändert bis zum 11. Tag. Hier hat es also, offenbar infolge des geringen N-Gehaltes der Nährlösung, gar keine Eiweißgeneration gegeben, es sei denn, sie hätte sich in den ersten Versuchstagen abgespielt. Diese Möglichkeit besteht, da bis zum 4. Tag keine Analyse gemacht wurde, und da zu diesem Zeitpunkt die Trockensubstanzzunahme in der Hauptsache abgeschlossen war. Immerhin zeigt der Versuch, daß starke Fettbildung und gleichzeitiges Wachstum bis zu einem gewissen Grade miteinander vereinbar sind. Volle Klarheit erhalten wir aber erst bei einem direkten Vergleich der Wachstumskurven für die Reihe A und B, wie er in der Abb. 13 durchgeführt ist. Aus dem Vergleich geht hervor, daß die Fettkultur (Reihe B) nur etwa mit der halben Geschwindigkeit gewachsen ist, wie die Eiweißkultur (Reihe A). In der gleichen Richtung liegen die

zahlreichen Beobachtungen, die bei den Phosphor-Mangelversuchen gemacht wurden. Dabei wurde festgestellt (vgl. Tab. 7), daß mit erhöhtem Fettgehalt regelmäßig eine verlängerte Generationsdauer verbunden war, z. B. von 7 auf 14 bzw. 22 Std. Man wird demnach den Begriff der Eiweiß- und Fettphase als gerechtfertigt aufrechterhalten, zumal er nicht nur bei Heterotrophen, sondern unabhängig davon auch bei Autotrophen in ähnlicher Weise aufgestellt wurde (v. WITSCH, 1946). Er ist aber dahin zu präzisieren, daß die Fettphase stets mit einem verlangsamten, gehemmten Wachstum gekoppelt ist.

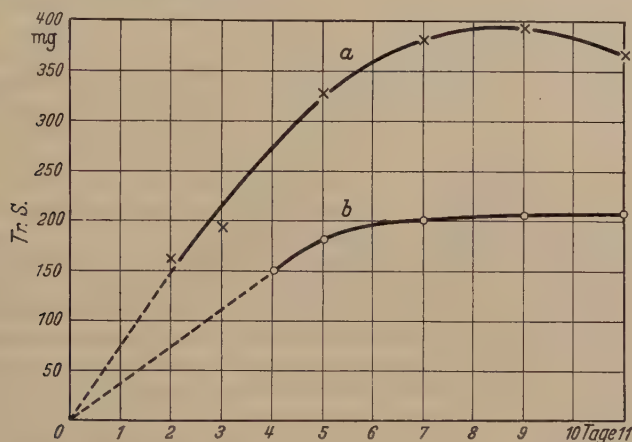


Abb. 13. Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit von *Endomyces v. kei* N-reicher (a) und N-ärmer Kultur (b). (nach Vers. von RAAF.)

Auf Grund der bei den N-Mangelversuchen festgestellten gegensätzlichen Beziehungen zwischen Eiweiß- und Fettsynthese hat RAAF folgende Hypothese aufgestellt: Bei der Kohlenhydratassimilation entsteht ein für die Eiweiß- und Fettbildung gemeinsames Ausgangsprodukt. Ist reichlich assimilierbarer Stickstoff vorhanden, so wird dieses Ausgangsprodukt vor allem für die Eiweiß-Synthese verwendet, im umgekehrten Fall für die Fettsynthese. Diese Vorstellung erfährt eine bedeutende Stützung und Erweiterung durch die Tatsache, daß nun auch der wesentliche Einfluß der Phosphorsäure auf den Fettstoffwechsel erwiesen worden ist. Bisher lagen hierzu nur Versuche von SMEDLEY-MACLEAN und HOFFERT (1923, 1924) vor, wonach der Zusatz von Phosphorsalzen zu Brauereihefe eine Beschleunigung und Steigerung der Fettbildung herbeiführen soll. Nach A. L. BITCHKOVSKAJA (1940) ergibt P-Überschuß bei *Endomyces* ein fettarmes Wachstum, während P-Mangel zu einer unvollständigen Ausnutzung des Zuckers führt.

Die im vorhergehendem Abschnitt näher beschriebenen Versuche haben erwiesen, daß erstens die Geschwindigkeit der Kohlenhydratassimilation bei aerober Züchtung direkt von der verfügbaren Menge an Phosphat abhängig ist. Zweitens wurde gezeigt, daß reichliche P-Versorgung zu gesteigerter Eiweißbildung führt, während P-Mangel eine erhöhte Fettbildung veranlaßt. Es sind demnach deutlich zwei Wirkungen der Phosphorsäure erkennbar:

1. Ein Einfluß auf die Geschwindigkeit des gesamten Zellstoffwechsels,
2. eine Steuerung der Stoffwechselvorgänge in Richtung auf Fett- bzw. Eiweiß-Synthese.

Aus der Gärungsphysiologie ist bekannt, daß der Kohlenhydrat-Abbau nur über eine festgelegte Stufenfolge von Veresterungen mit Phosphorsäure erfolgen kann. Beim oxydativen Kh-Abbau und der Assimilation sind unsere Kenntnisse noch nicht so eingehend. Jedoch steht fest, daß auch hier die einleitenden Schritte in Phosphorylierungen bestehen. So haben BARKER und LIPMANN (1949) bei *Propionibacterium pentosaceum* gezeigt, daß sowohl Glucose wie Arabinose oxydativ unter Aufnahme von anorganischem Phosphat verestert werden. Den im Zuge des Abbaues entstehenden  $\alpha$ -Ketosäuren, insbesondere der Brenztrauben- und der  $\alpha$ -Ketoglutar säure, wird eine besondere Rolle zugeschrieben, da sie die Bausteine für die Synthese sowohl der Kohlenhydrate als auch der Fett- und Aminosäuren bilden (vgl. LYNEN, 1942, ROINE 1947). Als Phosphorsäureendonatoren dienen bei diesen Synthesen energiereiche P-Verbindungen, wie Adenosin triphosphat und Acetylphosphat, die damit eine zentrale Stellung im Stoffwechselgeschehen einnehmen würden (vgl. BARKER u. BORNSTEIN 1948).

Bisher hat man meist die in den Zellen ablaufenden Veränderungen der Phosphatbindungen zu verfolgen versucht (LYNEN, 1940, Brandt, 1942). Dabei wurde die Zelle als geschlossenes System betrachtet und angenommen, daß die Phosphorsäure einen steten Kreislauf zwischen Veresterung und Freisetzung durchmacht. Diese Auffassung erweist sich nunmehr als zu eng, da zumindest für aerob wachsende Hefe mit einer steten Phosphatzufuhr in das Zellinnere gerechnet werden muß. Das Phosphat geht dort nach den hier beschriebenen Versuchen sehr wahrscheinlich direkt in organische Bindung über. Arbeiten von NICKERSON u. MULLINS (1948) und NICKERSON (1949) deuten in die gleiche Richtung. Das aufgenommene Phosphat wird danach als Polymetaphosphat gespeichert. Wenn es zutrifft, daß bestimmte Phosphorverbindungen, wie z. B. Adenosin triphosphat u.a., diejenigen Stoffe sind, welche die Energie für die Synthesevorgänge liefern, so ist damit auch zu erwarten, daß P-Mangel nicht nur eine Verlangsamung des Kh-Abbaues, sondern darüber hinaus eine allgemeine Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit zur Folge hat.

Ein Verständnis für die relative Förderung der Fettsynthese durch P-Mangel erscheint dagegen auf diesem Wege nicht erreichbar. Wenn wir aber das Augenmerk mehr auf die korrelierte Hemmung der Eiweiß-Synthese richten, so ergeben sich Beziehungen zu den Befunden über die Bedeutung der Nucleinsäuren im Zellstoffwechsel. Diesen komplexen, phosphorsäurehaltigen Eiweißkörpern kommt nach Untersuchungen von CASPERSSON (1941) sowie CASPERSSON u. BRANDT (1941) eine entscheidende Bedeutung für die Eiweiß-Synthese zu. Es ist heute eine allgemein anerkannte Tatsache, daß alle zu identischer Reproduktion befähigten Zellkomponenten wie Chromosomen, Plastiden und Cytoplasma, ebenso auch die Viren, nucleinsäurehaltig sind. Man hat sogar die Hypothese aufgestellt, daß die Fähigkeit zu identischer Reproduktion, also eine der Grundeigenschaften lebender Systeme, generell vom Vorhandensein der Nucleinsäuren abhängt (CASPERSSON u. SCHULTZ, 1938). Insbesondere ist CASPERSSON (l. c.) nach seinen experimentellen Ergebnissen der Ansicht, daß die in Hefe reichlich nachgewiesene Ribosenucleinsäure der Ort der Cytoplasma-Synthese ist. Bestätigungen für diese Ansicht sind inzwischen auch von verschiedenen anderen Seiten erbracht worden. So läßt sich bei Hefen durch Zusatz von Acridinfarbstoffen eine reversible Sistierung des Wachstums erreichen. Auf Zusatz von Nucleinsäuren beginnt das Wachstum wieder. Daraus erscheint der Schluß gerechtfertigt, daß die Wachstumshemmung durch eine Komplexbildung der Acridine mit Nucleinsäuren hervorgerufen wird (MASSART, 1947).



Wie bereits erwähnt, ist aber stets Phosphorsäure am Aufbau der Nucleinsäuren beteiligt. Es wäre daher denkbar, daß die Hefe bei P-Mangel weniger Ribose-Nucleotide bilden kann und somit die Eiweißsynthese gehemmt wird. Andererseits wurde mit Hilfe von radioaktivem Phosphor nachgewiesen, daß in nichtwachsenden Hefezellen der Phosphor der Nucleoproteide keine Umsetzung durchmacht. Werden die Zellen aber durch Zusatz von Ammonsulfat zur Proteinsynthese gebracht, so fließt Phosphor aus der Nucleoproteidfraktion ab (SPIEGELMANN, 1947). Nach all diesen Beobachtungen erscheint es sehr wohl möglich, daß P-Mangel in besonderem Maß geeignet ist, die Eiweiß-Synthese zu hemmen, so daß dann die vom Kh-Abbau herkommenden Bausteine vorzugsweise in den Weg der Fettsynthese gelenkt werden.

Wieweit diese Vorstellungen den Tatsachen entsprechen, wird erst die weitere Forschung zeigen können. Jedoch ergeben sich zumindest eine Reihe aussichtsreicher experimenteller Ansätze zur Klärung der angeschnittenen Fragen.

### b) Der maximale Fettkoeffizient.

Da Fett gegenüber Eiweiß den etwa 1,7fachen cal-Wert besitzt, so bedeutet die Fettspeicherung gleichzeitig eine Erhöhung des Energiegehaltes der Zelle. Es ist zu erwarten, daß dabei mehr Kohlenhydrat aufgewendet werden muß als für das normale Wachstum. Unter der Voraussetzung, daß der „Nutzeffekt“ des Kohlenhydratstoffwechsels eine Konstante ist, sollte daher der ökonomische Koeffizient mit steigendem Fettgehalt sinken.

Für eine Nachprüfung der Frage sind die meisten der bisherigen Versuchszahlen nicht brauchbar, da im allgemeinen mit natürlichen oder technischen Rohstoffen wie Molke, Holzzuckerwürze und Sulfitablauge gearbeitet wurde. Diese Substrate lassen aber eine exakte Bestimmung des ökonomischen Koeffizienten nicht zu, weil in ihnen neben den analytisch bestimmten Zuckeranteilen stets noch andere C-Quellen enthalten sind, die zum Teil ebenfalls assimiliert werden. Die in diesen Fällen ermittelten ökonomischen Koeffizienten fallen dementsprechend regelmäßig zu hoch aus. Ein besonders deutliches Beispiel dafür bieten einige Versuche von LINDNER (1922) mit *Endomyces* auf Fichtensulfitablauge. Der vergärbare Zucker dieser Abblauge war zu 15 bzw. 16 kg je 1000 l bestimmt worden, und die Trockensubstanz-Ausbeute zu 19,55 bzw. 10,08 kg. Nimmt man an, der vergärbare Zucker sei vollständig assimiliert worden, so ergeben sich folgende ökonomische Koeffizienten: Im ersten Fall 130 und im zweiten Fall 63. Derartige Werte sind natürlich unmöglich. Sie beweisen geradezu, daß *Endomyces vernalis* in dem betreffenden Substrat nicht nur den vergärbaren Zucker ausgenutzt hat, sondern noch eine beträchtliche Menge anderer C-Quellen, die bei der Bestimmung unberücksichtigt geblieben waren.

Es ist mithin erforderlich, sich auf diejenigen Fälle zu beschränken, bei denen rein synthetische Nährlösungen zur Anwendung kamen. Hier sind die Versuche von RAAF an *Endomyces vernalis* und *Zygorhynchus*



*Moelleri* sowie die von BERNHAUER u. RAUCH (1948) an *Mucor circinelloides* zu nennen. Trägt man die betreffenden Werte in ein Koordinatensystem ein, mit dem ökonomischen Koeffizienten als X-Achse und dem Fettgehalt als Y-Achse, so erhält man die in der Abb. 14 wiedergegebene graphische Darstellung. Trotz der Verschiedenartigkeit der Versuchsbedingungen und der Mikroorganismen geht aus der Darstellung klar hervor, daß der ökonomische Koeffizient mit steigendem Fett-

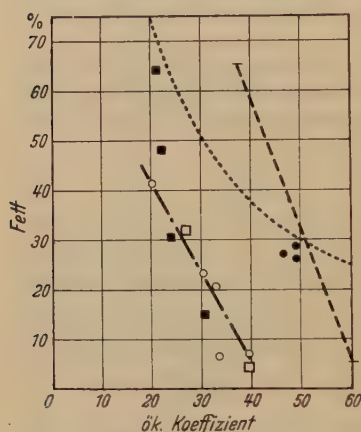


Abb. 14. Der maximale Fettkoeffizient. Dargestellt durch die Beziehung zwischen Fettgehalt und maximalem ökon. Koeffizienten bei verschiedenen Mikroorganismen (nach Vers. von RAAF und BERNHAUER).  
 ○ = *Endomyces vernalis*. ● = desgl. bei Permutitzusatz. □ = *Zygoryhynchus Moelleri*. ■ = *Mucor circinelloides*.  
 --- = Theoretische Linie für den maximalen Fettkoeffizienten. = Kurve für Fettkoeffizient = 15.

gehalt regelmäßig sinkt. Durch die für *Endomyces* gefundenen Punkte läßt sich eine Gerade legen, der sich die übrigen Werte gut zuordnen. Lediglich die Werte für *Endomyces* auf Permutitzkultur fallen gänzlich heraus. Sie werden anschließend eigens besprochen.

Allgemein bestätigt die Darstellung nicht nur das Sinken des ökonomischen Koeffizienten mit steigendem Fettgehalt, sondern sie deutet durch die Gerade an, daß die Möglichkeit einer bestimmten Beziehung zwischen den beiden Größen besteht. Auffällig ist, daß die Werte für den ökonomischen Koeffizienten durchweg verhältnismäßig niedrig liegen, sie bewegen sich zwischen 20 und 40%. Dementsprechend sind auch die Fettkoeffizienten, die sich durch Multiplikation des Fettgehaltes mit dem ökonomischen Koeffizienten ergeben, relativ gering. Ihre Werte betragen 8–13%. Nun ist es an sich eine

alte Erfahrung, daß Mikroorganismen in synthetischen Nährböden oft schlechtes Wachstum zeigen, da es ihnen dabei an Spurenelementen oder Wirkstoffen fehlt. Es wäre also durchaus möglich, daß die oben genannten Werte in günstiger zusammengesetzten Nährböden weit überboten werden könnten. Für die mikrobiologische Fettgewinnung ist es aber generell von großer Bedeutung zu wissen, welche maximale Fettausbeute möglich ist, bzw. welche Höchstwerte der Fettkoeffizient annehmen kann. Auf Grund allgemeiner energetischer Überlegungen hat RIPPEL-BALDES (1940) ermittelt, daß ein Fettkoeffizient von 15 etwa den Höchstwert darstellt. Die experimentellen Ergebnisse stehen damit im wesentlichen in Übereinstimmung, 12–14 g Fettausbeute bezogen auf 100 g assimilierte C-Quelle können praktisch erreicht werden.

Da man den Fettgehalt weitgehend in der Hand hat und bis zu sehr hohen Werten hinauftreiben kann, z. B. 64,8% bei *Mucor*, so stellt die Trockensubstanzausbeute den begrenzenden Faktor für den Fettkoeffizienten dar. Es handelt sich also im Grunde um die Frage, welche Höhe der ökonomische Koeffizient in Abhängigkeit vom Fettgehalt erreichen kann.

Theoretische Vorstellungen darüber, welche Höchstmenge an Trockensubstanz ein Mikroorganismus aus einer definierten Menge assimilierter C-Quelle bilden kann, bestehen bisher kaum. Es kommt dabei auf die Größe des Atmungsverlustes an. RIPPEL-BALDES nimmt dafür 30% als Grenzwert an, d. h. von 100 cal der assimilierten C-Quelle sollen mindestens 30 durch Atmung verloren gehen, so daß die gebildete Trockensubstanz im Höchstfall den cal-Wert 70 darstellen kann. Auf dieser Grundlage sind dann die Berechnungen für den maximalen Fettkoeffizienten durchgeführt.

Bei *Aspergillus niger* wurde experimentell festgestellt, daß etwa 42% des aufgenommenen Kohlenstoffes als CO<sub>2</sub> im Betriebsstoffwechsel verloren gehen (FLIEG, 1922). Bei *Oospora lactis* auf Molke ergab sich ein Verlust von 44,7% (M. SCHMID, 1938)<sup>1</sup>.

Die für Pilze experimentell ermittelten ökonomischen Koeffizienten liegen verhältnismäßig niedrig, im Durchschnitt bei 40. Sie sind für junge Mycelien am höchsten. Als Maximalwerte wurden bei *Aspergillus niger* 43 und bei *Asp. orycae* 48 gemessen (TERROINE u. WURMSER, 1921, TAMIYA, 1932).

Bei *Torulopsis utilis* ist die Frage der theoretischen Maximalausbeute speziell geprüft worden (FINK, KREBS u. LECHNER, 1939). Als experimenteller Höchstwert wurde ein ökonomischer Koeffizient von 52—53 festgestellt. Gleichzeitig wurden auf Grund der CO<sub>2</sub>-Entwicklung theoretische Vorstellungen über die mögliche Höchstaussbeute entwickelt. Sie gehen darauf zurück, daß die C-Verluste durch CO<sub>2</sub>-Abgabe bei aerober Züchtung sich erfahrungsgemäß einem unteren Grenzwert von 33%, bezogen auf vollständige Verbrennung des verbrauchten Zuckers, nähern. Auf Grund dessen wird angenommen, daß vom aufgenommenen Kohlenstoff mindestens  $\frac{1}{3}$  als CO<sub>2</sub> wieder abgegeben wird, während höchstens  $\frac{2}{3}$  in Zellsubstanz umgeformt werden können. Diese Zwangsläufigkeit ergibt sich, wenn man annimmt, daß die ersten Stufen des aeroben Kohlenhydratstoffwechsels bis zum Acetaldehyd ebenso verlaufen wie bei der alkoholischen Gärung:



Von den 6 C-Atomen der Glucose werden danach 2, d. h.  $\frac{1}{3}$ , als CO<sub>2</sub> frei und 4, d. h.  $\frac{2}{3}$ , können maximal als Baustein für neue Zellsubstanz

<sup>1</sup> In der betreffenden Veröffentlichung ist der C-Verlust mit 35,45% angegeben. Das ist offenbar ein Druckfehler. Es soll heißen 39,45% bezogen auf insgesamt gebotene C-Menge.

verwendet werden. Diese Hypothese findet durch neuere Untersuchungen von CLIFTON (1947) eine Ergänzung und Bestätigung. Er ist der Ansicht, daß die Dissimilation allgemein weniger der Energiebeschaffung als vielmehr der Bereitstellung von Bausteinen für die Zellsynthesen dient. Das Ausmaß der Assimilation richtet sich daher nicht nach dem Energiegehalt der jeweils verarbeiteten C-Quelle, sondern vielmehr nach stöchiometrischen Gesichtspunkten. Er fand bei *Sacch. cerevisiae* in aerober Kultur, daß regelmäßig etwa 33% des für die völlige Oxydation der verbrauchten Glucose erforderlichen Sauerstoffs aufgenommen und ebenso etwa 33% an CO<sub>2</sub> abgegeben wurde. Entsprechend dem gegenüber der obigen Gleichung erhöhten Sauerstoffverbrauch stellte er folgende Gleichung für die oxydative Assimilation der Glucose auf:



Auch hiernach sind höchstens  $\frac{2}{3}$  des Kohlenstoffs der Glucose für die Synthese neuer Zellsubstanz verfügbar.

100 g Glucose enthalten 40 g C. Davon können demnach maximal  $\frac{2}{3} = 26,7$  g in Hefezellsubstanz umgewandelt werden, während 13,3 g C in Form von 48,9 CO<sub>2</sub> abgegeben werden müssen. Der C-Gehalt der Hefetrockensubstanz, ebenso wie der der Pilztrockensubstanz, kann durchschnittlich zu 45—47% angenommen werden (TAMIYA). Danach ergibt sich als theoretische Grenze für den ökonomischen Koeffizienten ein Wert von rund 57—60.

Von hier aus ist es nun möglich, auch den Versuch zu einer schärferen Fassung der theoretisch möglichen Fettausbeute zu machen. Der Verbrennungswert für 1 g Hefe- bzw. Pilztrockensubstanz ergibt sich im Durchschnitt zu 4,8 Kal (TAMIYA). 60 g Trockensubstanz stellen danach 288 Kal. dar, d. h. rund 77% des im assimilierten Zucker gegebenen Wärmewertes. Nimmt man an, daß die Energieausnutzung eine Konstante ist, so müßte bei der Fettspeicherung der ökonomische Koeffizient proportional zur Steigerung des Energieinhaltes der Zellen absinken. Daß die Fettspeicherung eine Zunahme des kalorischen Wertes bewirken muß, ist offensichtlich. Nach eigenen Untersuchungen ergaben sich beim Vergleich zweier Hefen die Werte der Tab. 8. Die Hefe mit 18% Rohfettgehalt besaß also bereits einen um 0,5 Kal/g erhöhten Wärmewert.

Tabelle 8.

	Rohfett in % d. Tr.-S.	Rohprotein in % der Tr.-S.	Kal/g Tr.-S.
Eiweißhefe .....	5,1	49,3	4,8
Fetthehe .....	18,2	29,0	5,3

Weitere derartige Messungen des Wärmewertes bei verschiedenen Fettgehalten liegen bisher nicht vor. Es ist jedoch möglich, auf Grund

der empirischen analytischen Durchschnittszusammensetzung der Zelle angenäherte Werte für deren Energiegehalt zu berechnen (RIPPEL-BALDES, 1940). Setzt man für Kohlenhydrate den cal-Wert = 1, dann resultiert für Eiweiß 1,7 und für Fett 2,5.

In Tab. 9 sind die danach erhaltenen Zahlen für verschiedene Fettgehalte zusammengestellt. Das Ansteigen des kalorischen Wertes mit

Tabelle 9. *Beziehung zwischen Fettgehalt und cal-Wert der Trockensubstanz.*

Zusammensetzung der Trockensubstanz	%	cal-Wert	%	cal-Wert	%	cal-Wert	%	cal-Wert
Fett .....	5	12,5	20	50	40	100	50	125
Eiweiß .....	50	75	30	45	10	15	5	7,5
Restl. org. Substanz* .....	37	37	42	42	46	46	41	41
Asche .....	8	—	8	—	4	—	4	—
Kal. Summe .....		124,5		137		161		173,5

\* Die restliche organische Substanz wird als Kohlenhydrat aufgefaßt mit dem kal. Wert = 1.

dem Fettgehalt ist klar ersichtlich. Daß die auf diese Weise gefundenen Näherungswerte den Tatsachen entsprechen, geht aus einem Vergleich mit der experimentell für 18% Fettgehalt ermittelten Zahl von 5,3 cal. hervor. Setzt man den Ausgangswert 124,5 dem für Eiweißhefe geltenden Wert von 4,8 cal gleich, so entspricht der Wert  $137 \approx 5,28$  cal. Die Übereinstimmung ist also gut. Die theoretisch möglichen ökonomischen Koeffizienten müßten sich dann umgekehrt verhalten wie  $124,5 : 137 : 161 : 173,5$ . Mit 60 als Ausgangspunkt für den ökonomischen Koeffizienten bei 5% Rohfettgehalt ergibt sich dann die in Tab. 10

Tabelle 10. *Grenzwerte für den ökonomischen Koeffizienten bei steigendem Fettgehalt.*

Rohfett in % d. Tr.-S.	Maxim. ök. Koeffizient
5	60
20	54,5
40	46,4
50	43,5
60	39,0

wiedergegebene Zahlenreihe für die Grenzwerte des ökonomischen Koeffizienten bei steigendem Fettgehalt. Die Verbindung der entsprechenden Punkte ergibt in unserem Koordinatensystem eine verhältnismäßig steile Gerade (Abb. 14). Diese Gerade veranschaulicht, in welchem Maß der maximale ökonomische Koeffizient mit steigendem Fettgehalt sinken muß. Als Voraussetzung gilt stets, daß der Kohlenhydratstoffwechsel mit einer Höchstenergieausnützung von 77% arbeitet,



unabhängig vom Fettgehalt. Es fällt zunächst auf, daß die für *Endomyces* experimentell gefundene Ausbeutelinie angenähert parallel dazu verläuft. Sie stellt gewissermaßen etwas Ähnliches auf einer niedrigeren Stufe des ökonomischen Koeffizienten dar. Es ist also wahrscheinlich, daß unserer theoretischen Maximalausbeutelinie eine gewisse reale Bedeutung zukommt. Auch die vorher so ausgefallenen Punkte für die Permutit-Versuche (RAAF) lassen sich jetzt besser einordnen. Die Permutitkultur unterschied sich dadurch von den anderen Versuchen, daß hier das  $\text{NH}_3$  der Nährlösung an Permutit gebunden war und nur nach Maßgabe des Verbrauchs durch den Pilz vom Permutit nachgeliefert wurde. Wie bereits RAAF erwähnte, verläuft der Stoffwechsel unter diesen Umständen offenbar mit einer besonders hohen Ökonomie, so daß trotz der relativ hohen Fettgehalte von 26—28%, ökonomische Koeffizienten von 46—48 erreicht wurden. Dabei bleiben die Werte jedoch, wie zu fordern, eindeutig unterhalb der theoretischen Grenze.

Eine eigenartige Folgerung der hier entwickelten theoretischen Maximalausbeutelinie ist die, daß der Fettkoeffizient mit steigendem Fettgehalt stetig zunimmt. Es ergeben sich danach für die verschiedenen Fettgehalte die in Tab. 11 angeführten Grenzwerte für die Fettausbeute bezogen auf 100 g verbrauchten Zucker.

Tabelle 11. *Beziehung zwischen Fettgehalt und maximalem Fettkoeffizienten.*

Fettgehalt in % d. Tr.-S.	Maximaler Fettkoeffizient
5	3
10	5,8
20	10,9
30	15,1
40	18,5
50	21,7
60	23,4

Es ist aus mehreren Gründen verständlich, daß die Linie für den maximalen Fettkoeffizienten nicht beliebig nach oben und unten ausgezogen werden kann. Sie kann offensichtlich nur zwischen bestimmten Grenzen gelten, die durch biologische Gegebenheiten bedingt sind. Die Grenzen liegen darin, daß der Rohfettgehalt weder beliebig sinken noch steigen kann. Zu jeder lebensfähigen Zelle gehört aller Wahrscheinlichkeit nach ein bestimmter Mindestgehalt an Lipoiden, Phosphatiden und Sterinen (BELIN, 1926). Andererseits kann der Rohfettgehalt auch eine obere Grenze nicht überschreiten, da sonst nicht mehr genügend Raum für den eigentlichen Träger der Lebensfunktionen, das Cytoplasma, sowie für die übrigen Zellkomponenten wie Kohlenhydrate, Zellwände und Aschebestandteile vorhanden ist. So sind bisher bei Hefen

nur in einem Fall 50% Rohfett überschritten worden (*Rhodotorula gracilis* nach ENEBO u. Mitarb., 1946). Bei Pilzen scheint das Maximum bei etwa 65% zu liegen. Insbesondere ist durch das Sinken des Protoplasma-Eiweißgehaltes zwangsläufig eine mit steigendem Fettgehalt zunehmende Behinderung der Lebensprozesse zu erwarten. Es ist daher z. B. fraglich, ob bei 50% Fett und nur 5—10% Eiweißgehalt der energetisch noch möglich erscheinende ökonomische Koeffizient von 43,5 (Fettkoeffizient = 21,7) zellphysiologisch realisierbar wäre. Die Experimente, so weit bis jetzt vorhanden, deuten jedenfalls darauf hin, daß bei hohen Fettgehalten ein stärkeres Absinken des ökonomischen Koeffizienten stattfindet, als es der theoretischen Linie entspricht (vgl. Abb. 14). Es ist ohne weiteres denkbar, daß bei so geringen Eiweißgehalten der energetische Nutzeffekt zwangsläufig absinken muß gegenüber eiweißreichen Zellen. Ferner ist durch die oben geschilderten Phosphatversuche experimentell erwiesen, daß mit steigendem Fettgehalt ganz allgemein die Reaktionsgeschwindigkeit der Lebensprozesse stark abnimmt. Schon dies bedeutet eine zunehmende Verschlechterung des Nutzeffektes.

Eines jedoch ist als Ergebnis dieser Überlegungen festzuhalten: Der Fettkoeffizient steigt mit zunehmendem Fettgehalt. So tritt bei 20% Rohfettgehalt ein maximaler Fettkoeffizient von rund 11 g auf. Mehr als 11 g Fettausbeute bezogen auf 100 g verbrauchten Zucker sollen bei diesem Fettgehalt also nicht möglich sein. Erst von 30% Fettgehalt an erscheint ein Fettkoeffizient von 15 als möglich. Die bisherigen experimentellen Ergebnisse stehen damit in vollem Einklang. Fettkoeffizienten bis zu rund 18 werden erst bei 40% und mehr Fettgehalt erreichbar. Allerdings sind hier aus den oben erörterten Gründen zunehmende Schwierigkeiten zu erwarten. Man wird daher für praktische Zwecke die günstigsten Ergebnisse bei einem Fettgehalt von rund 30% erzielen können. Besonders deutlich werden diese Verhältnisse durch einen Vergleich mit der Kurve für den Fettkoeffizienten = 15, die ebenfalls in das Koordinatensystem der Abb. 14 eingetragen ist. Der genannte Wert stellt, wie bereits erwähnt, nach RIPPEL-BALDES etwa das Maximum des Erreichbaren dar. Er ist bisher jedoch mehrfach überschritten worden, so bei *Candida Reukaufii*, *Mucor circinelloides* und *Rhodotorula gracilis*. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, daß in diesen Fällen zum Teil keine genau definierte C-Quelle vorlag, wie die Autoren selbst bemerkten. Der ökonomische Koeffizient ist dementsprechend hier wahrscheinlich etwas zu hoch gefunden worden und hat vielleicht auf diese Weise die Überschreitung der Grenzlinie herbeigeführt. In einigen Fällen ist jedoch die Überschreitung des bisherigen Grenzwertes so bedeutend, daß sie nicht mehr allein auf Grund der Unsicherheit der C-Quellenbestimmung erklärbar ist. Das trifft z. B. zu bei *Rhodotorula gracilis*, wo bei Fettgehalten bis zu 64% Fettkoeffizienten

bis zu 20 ermittelt wurden. Es erscheint daher auch von der experimentellen Seite her gerechtfertigt, den maximalen Fettkoeffizienten im Sinne der hier entwickelten Vorstellungen nicht als einen festen Grenzwert aufzufassen, sondern vielmehr als eine Funktion des Fettgehaltes. Zu jedem Fettgehalt gehört ein bestimmter maximaler Fettkoeffizient, der, wie in Tab. 11 dargestellt, bei 50% Rohfett 21,7 und bei 60% Rohfett sogar 23,4 beträgt. Ordnet man die bei *Rhodotorula gracilis* erhaltenen experimentellen Werte in dieses System ein, so ergibt sich, daß auch sie, wie zu fordern, unterhalb der theoretischen Grenze bleiben.

### Zusammenfassung.

1. Es wird ein neues Züchtungsverfahren für Mycelpilze mit Oberflächenwachstum beschrieben, bei dem hängende Gitter verwendet werden und das eine sterile kontinuierliche Kultur bei erhöhter Flächenausnutzung erlaubt.

2. Der Phosphatstoffwechsel der Hefe bei kontinuierlicher aerober Züchtung wird experimentell untersucht. Dabei wird gezeigt,

a) daß die Hefezelle unter diesen Bedingungen laufend und rasch Phosphat aufnimmt bis zu einer bestimmten Sättigungsgrenze;

b) daß es durch dosierte Phosphatzufuhr möglich ist, den Phosphatgehalt der erzeugten Hefe willkürlich zwischen etwa 0,5 und 5%  $P_2O_5$  bezogen auf Trockensubstanz zu regulieren;

c) daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der Kohlenhydratassimilation, des Wachstums und der in der Zelle vorhandenen Phosphatmenge besteht;

d) daß über die Phosphatzufuhr eine Steuerung des aeroben Stoffwechsels der Hefe erreicht wird, wobei reichliche Phosphatversorgung eine gesteigerte Eiweißsynthese und Phosphatmangel eine gesteigerte Fettsynthese bewirkt;

e) daß es unter Phosphatmangel möglich ist, fettreiche Hefe in großtechnischem Maßstab aus Sulfitablaugen zu züchten.

3. Es wird eine theoretische Vorstellung über die physiologische Wirkung des Phosphatmangels gegeben, wonach erstens Phosphatmangel durch Hemmung der Kohlenhydratassimilation eine allgemeine Verlangsamung des Stoffwechsels herbeiführt, und zweitens eine spezifische Hemmung der Eiweißsynthese über die phosphorsäurehaltigen Nucleotide. Diese Hemmung der Eiweißsynthese soll sekundär die Steigerung der Fettbildung zur Folge haben, da die von der Kohlenhydratassimilation herkommenden Bausteine mehr in den Weg der Fettsynthese gelenkt werden.

4. Es wird eine Kurve für den theoretisch möglichen maximalen Fettkoeffizienten entwickelt.



## Literatur.

- BARKER, H. A.: *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microb. Serol.* **12**, 167 (1947). — BARKER, H. A., u. F. LIPMANN: *J. of biol. Chem.* **179**, 247 (1949).; Ref.: *Berichte A* **68**, 59 (1950). — BELIN, P.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **8**, 1081, 1120 (1926). — BERNHAUER, K., u. J. RAUCH: *Biochem. Z.* **319**, 77 (1948). — BERNHAUER, K., A. NIETHAMMER, u. J. RAUCH: *Biochem. Z.* **319**, 94 (1948). — BITCHKOVSKAJA, A. L.: *Microbiol. (russ.)* **8**, 1170 (1940). — BORNSTEIN, B. T., u. H. A. BARKER: *J. Biol. Chem.* **172**, 659 (1948). — BRANDT, K.: *Die Naturwissensch.* **30**, 278 (1942). — CASPERSSON, T.: *Die Naturwissensch.* **29**, 33 (1941). — CASPERSSON, T. u. K. BRANDT: *Protoplasma* **35**, 507 (1941). — CASPERSSON, T., u. SCHULTZ: *Nature (London)* **142**, 294 (1938). — CLAASEN, H.: *Biochem. Z.* **275**, 350 (1935). — CLIFTON, CH. E.: *A. v. Leeuwenhoek. J. Microb. a. Serol.* **13**, 184 (1947). — DAMM, H.: *Chemiker-Ztg.* **67**, 47 (1943). — ENEBO, L.: ANDERSON u. H. LUNDIN: *Arch. Bioch.* **11**, 383 (1946), zit. n. PRESCOTT u. DUNN: *Industrial Microbiology*; McGraw Hill, New York (1949). — FINK, H., H. HÄHN, u. E. HÖRBURGER: *Chemiker-Ztg.* **61**, 689 (1937). — FINK, H., J. KREBS u. R. LECHNER: *Biochem. Z.* **301**, 143 (1939). — FLIEG, O.: *Jb. Bot.* **61**, 24 (1922). — GEFFERS, H.: *Arch. Mikrobiol.* **8**, 66 (1937). — HAESELER, G., u. H. FINK: *Z. Spiritus-Ind.* **63**, 89 (1940). — HEIDE, S.: *Arch. Mikrobiol.* **10**, 135 (1939). — HEVESY, LINDERSTRÖM-LANG u. NIELSEN: *Nature (London)* **140**, 725 (1937). — LINDNER, P.: *Angew. Chemie* **35**, 110, 521 (1922). — [1]: (*Kriegsaus-schuß f. pflanzl. u. tierische Fette u. Öle*, Berlin) *DRP Nr.* 320560 (1917). — [2]: *DRP Nr.* 307789 (1917); [3]: *DRP Nr.* 305091 (1917). — LOHMANN, K., u. L. JENDRASSIK: *Biochem. Z.* **178**, 419 (1926). — LYNNEN, F.: *LIEBIGS Ann.* **546**, 120 (1940). — *Die Naturwissensch.* **30**, 398 (1942). — MCFARLANE, J.: *Biochemic. J.* **33**, 565 (1939). — MALM, C.: *Die Naturwissensch.* **29**, 318 (1941). — MASSART, L.: *Experientia* **3**, 288 (1947). — MEYERHOF, O.: *Biochem. Z.* **162**, 43 (1925). — NADSON, G., u. A. KONOKOTINA: *Wschr. f. Brauerei* **41**, 249 (1924). — NÄGELI, C. v., u. O. LOEW: *LIEBIGS Ann.* **193**, 322 (1878). — *J. prakt. Chemie* **21**, 97 (1880). — NICKERSON, W. J.: *Experientia* **5**, 202 (1949). — NICKERSON, W. J., u. L. MULLINS: *Nature (London)* **161**, 939 (1948). — NILSSON, R., L. ENEBO, H. LUNDIN u. K. MYRBÄCK: *Sv. Kem. Tidskr.* **55**, 41 (1943). — PRESCOTT, S. C., u. C. G. DUNN: *Industrial Microbiology*. McGraw Hill, New York (1949). — RAAF, H.: *Arch. Mikrobiol.* **12**, 131 (1941). — RIPPEL-BALDES, A.: *Arch. Mikrobiol.* **11**, 271 (1940). — RIPPEL-BALDES, A., C. PIETSMANN-MEYER u. W. KÖHLER: *Die Naturwissensch.* **31**, 248 (1943). — *Arch. Mikrobiol.* **14**, 113 (1948). — ROINE, PAAVO: *Helsinki, Dis-sertation* 1947, Ref.: *Berichte A* **65**, 84 (1949). — SCHMIDT, M.: *Vorratspfl. u. Lebensmittelforschg.* **1**, 150 (1938). — SCHULZE, K. L.: *DRP Nr.* 731657 (1940) u. *DRP Nr.* 752271 (1941). — SEIDEL, M.: *Schweiz. Pat. Nr.* 225551 (1941, D. Prior. 13. 12. 40). — SMEDLEY-MCLEAN, J., u. D. HOFFERT: *Biochemic. J.* **17**, 720 (1923); **18**, 1273 (1924). — SOETERS, C. I.: *Olien, Vetten en Oliezaden* **26**, 63 (1941). — SPIEGELMANN, S.: *Cold Spring Harbor Symposia* **11**, 256 (1947). — STEINER, M.: *Biochem. Z.* **307**, 330 (1941). — TAMIYA, H.: *Acta Phytochimica* **6**, 265 (1932). — TERROINE, E. F., u. J. WURMSER: *C. r. Ac. Sci. (Paris)* **173**, 482 (1921). — v. WITSCH, H.: *Die Naturwissensch.* **33**, 221 (1946).



Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.

## Vorkommen von *Azotobacter agilis* Beijerinck in Deutschland.

Von

HERTA FÜCHTBAUER.

(Eingegangen am 10. Oktober 1949.)

*Azotobacter agilis*, 1901 erstmalig von BEIJERINCK beschrieben, ist ein Wasserbakterium, das den Stickstoff der Luft bindet. Da es wegen einer ähnlichen Farbstoffausscheidung leicht mit *Azotobacter Vinelandii* verwechselt wird, lehnten KLUYVER u. VAN REENEN die Identität aller bisher als *Azotobacter agilis* isolierten Organismen mit dem von BEIJERINCK untersuchten Stamm ab. Sie vermuteten zunächst, daß sein Vorkommen auf die holländischen Binnengewässer beschränkt sei, denn er wurde mit Sicherheit nur aus dem Kanalwasser in Delft (BEIJERINCK, KLUYVER u. VAN REENEN) und aus einem Vorfluter in Wageningen, in den Abwässer einer Papierfabrik mündeten (KLUYVER u. VAN DEN BOUT, ein Stamm von K. T. WIERINGA), isoliert. Jedoch mußte diese Annahme erweitert werden, da sich *Azotobacter agilis* auch in England fand. Die Identität des von NICOL in den Norfolk Broads an der Ostküste Englands aus einem Entwässerungskanal isolierten Stammes mit dem holländischen wurde von KLUYVER bestätigt.

Es wird allgemein angenommen, daß der Organismus eine Sonderstellung unter den Bakterien einnimmt, da sein Vorkommen auf wenige Standorte beschränkt ist. *Azotobacter agilis* wächst auf allen Nährböden schlechter als die anderen *Azotobacter*-Arten, ist daher schwer zu isolieren und wird leicht überwuchert. Vielleicht ist die selten gelungene Isolierung allein diesen Umständen zuzuschreiben.

### 1. Isolierung.

Es wurde zunächst versucht, diesen Organismus aus dem 17 km östlich von Göttingen gelegenen Seeburger See zu isolieren, einem etwa 1 qkm großen Binnengewässer in der Buntsandsteinhochfläche des Eichsfeldes. Nach den von den oben angegebenen Autoren beschriebenen Methoden wurden zunächst Anreicherungskulturen angesetzt: 0,1% Agar-Agar, 2% Mannit, 0,1% sekundäres Kaliumphosphat, 0,1% Calciumcarbonat, 0,5% Magnesiumsulfat, 10 mg% Eisensulfat und Spuren Erde (Molybdän). Mannit ist für das Wachstum ungünstiger als Glykose, zur Unterdrückung der Begleitorganismen jedoch vorteilhaft.

In der Anreicherung einer Schlammprobe aus etwa 30 cm Tiefe, die im November 1945 aus dem Seeburger See entnommen wurde, zeigten sich nach einem Monat große, monadenförmige, besonders bewegliche, glasklare Zellen. Die Trübung der Kultur war bläulich, die Decke braun. Die zweite Anreicherungskultur dieser Stammkultur färbte sich nach einem weiteren Monat leuchtend rot. Nun war die Wahrscheinlichkeit, daß es sich um *Azotobacter agilis* handelte, schon ziemlich groß, denn

BEIJERINCK erzielte Violettfärbung auch erst bei älteren Kulturen. Alle von ihm beschriebenen Merkmale stimmten mit diesem Organismus überein: er hatte besonders große Zellen ( $4 \times 4 \mu$ ), die mit mehreren Geißeln, falls genügend Sauerstoff zur Verfügung stand, sehr lebhaft schwärmten. Auf Mannitagar bildete er nach 2—3 Tagen kleine (1—2 mm) trockene Kolonien, schied einen wasserlöslichen grünen bis violetten Farbstoff aus und hinterließ in die Umgebung des Impfstriches hinein ein weißes Präzipitat. Es könnte noch hervorgehoben werden, daß die flachen Kolonien sowie Impfstriche auf Glykoseagar nicht immer Farbstoff ausschieden, wie auch KLUYVER und VAN DEN BOUT feststellten. Die Kolonien färbten sich im Alter in der Mitte hellbraun. Die Farbstoffausbildung konnte im Gegensatz zu KAYSERS Angaben (bei denen es sich wahrscheinlich um eine andere *Azotobacter*-Art handelte) auch durch tagelanges Beleuchten mit einer Glühbirne bei Wasserkühlung nicht forciert werden. Die weißen Niederschläge um die Kolonien erwiesen sich als Ausfällungen von kohlen-saurem Kalk.

Die Reinzüchtung war sehr schwierig, da *Azotobacter agilis* von den schleimigen Begleitorganismen kaum zu trennen war und ohne diese sehr spärlich wuchs. Es wurden im ganzen über 60 Passagen abwechselnd über flüssigen und festen Nährböden durchgeführt, bis der Organismus (7 Monate nach der ersten Isolierung) ganz rein war. Für die Passagen wurden die von BEIJERINCK, KLUYVER u. VAN REENEN angegebenen Nährböden benützt: Möhrenagar, Mannitagar (an Stelle von Mannit wurde auch Lävulose, oder für Reinkulturen Glykose genommen), Kreideagar und Gipsplatten mit Nährlösung.

Alle von FISCHER angegebenen Kontrollen auf Reinheit (mikroskopische Untersuchungen, Impfungen in Bouillon und auf Peptonbouillon-Agar mit Oxalatzusatz) wurden durchgeführt, sowie die von KLUYVER und VAN REENEN angeführten Prüfungen auf Identität. So wurde *Azotobacter agilis* mit *Azotobacter chroococcum*, *Az. Vinelandii* und *Az. Beijerinckii* auf verschiedenen Nährböden mikroskopisch und makroskopisch verglichen. Da alle Merkmale genau übereinstimmten, und die Unterscheidung von den anderen *Azotobacter*-Stämmen sehr einfach war, lag hier ohne jeden Zweifel *Azotobacter agilis* identisch dem Stamme von BEIJERINCK vor.

## 2. Vorkommen.

Nachdem die erste Isolierung verhältnismäßig leicht gelungen war, schien es von Interesse, ob das Vorkommen von *Azotobacter agilis* an das Wasser gebunden ist und ob sich seine Standorte von denen des *Az. chroococcum* unterscheiden. *Az. agilis* ist wahrscheinlich eine typische Wasserform (BEIJERINCK) und hat im Gegensatz zu den anderen *Azotobacter*-Arten folgende Eigenschaften: Die Zellen sind stromlinienförmig und haben kräftige Geißelbüschel, sind daher noch in alten Kulturen sehr beweglich. Sie bilden keine Dauerformen (BEIJERINCK) im Gegen-

satz zu den Zellen von *Az. chroococcum* (PRAZMOWSKY). *Az. agilis* gedeiht bei 20° besser als bei höheren Temperaturen. Es wächst in flüssigen Nährlösungen mit großen Zellen, auf festen Nährböden bildet es trotz seiner Beweglichkeit nur sehr kleine Kolonien und Zellen. Außerdem scheint es im Konkurrenzkampf besonders schwach zu sein, kann also bei der geringen Bakterienkonzentration im Wasser besser gedeihen. Es wurde nachgeprüft, ob die Wasserform *Az. agilis* gegen Austrocknung empfindlicher ist als die 3 anderen Formen. *Az. chroococcum* hält sich im allgemeinen nach Austrocknung noch 10 Jahre (OMELIANSKY, zitiert nach RIPPPEL-BALDES, S. 129). Auf Deckgläsern ausgestrichene Kulturflüssigkeit der 4 *Azotobacter*-Arten wurde bei 20° 48 Std getrocknet und dann in Erlenmeyerkolben mit Kulturlösung gebracht. Der *Agilis*-Kolben zeigte keine Trübung, die Kultur war abgestorben, die 3 anderen Kolben waren bewachsen. Am stärksten war die Entwicklung bei *Az. chroococcum* (allerdings Involutionsformen bis 45  $\mu$ ) und *Az. Vinelandii*.

Um zu erfahren, ob dieser Befund eine ökologische Bestätigung findet, wurden 7 zu verschiedenen Zeitpunkten (Oktober 1945 bis Mai 1946) aus dem Seeburger See und der Erde entnommene Proben auf das Vorkommen von *Az. chroococcum* und *Az. agilis* untersucht.

Tabelle 1. Vorkommen von *Azotobacter* im Seeburger See.

Die Ziffern geben an, bei wie vielen Probenentnahmen *Azotobacter* isoliert wurde.

Seeburger See	<i>Az. chroococcum</i>	<i>Az. agilis</i>
Wasser . . . . .	3	1
Uferschlamm . . . . .	3	1
Schilf . . . . .	—	—
Algen (Ufer) . . . . .	7	—
Algen (Kahn) . . . . .	7	—
Pfostenbelag (Algen)		
über Wasser . . . . .	7	—
Pfostenbelag (Algen)		
unter Wasser . . . . .	7	—
Erde am See . . . . .	7	—

Wie erwartet, fand sich *Az. agilis* nur im Wasser, *Az. chroococcum* dagegen an allen untersuchten Standorten mit Ausnahme des Schilfes. Nach J. REINKE (zitiert nach BAIER) soll *Az. chroococcum* mit *Volvox* vergesellschaftet sein, nach M. SCHROEDER (zitiert nach RIPPPEL-BALDES, S. 295) mit *Chlorella*. Dementsprechend wurde *Az. chroococcum* bei allen Algenproben gefunden, auf dem Pfostenbelag über Wasser sogar in noch stärkerer Konzentration als in der Erde. Aus dem Wasser konnte es nicht immer isoliert werden, jedoch öfter als *Az. agilis*, das nur bei 2 Probenentnahmen gefunden wurde. Da *Az. chroococcum* aus diesen beiden Proben nicht isoliert wurde, besteht die Wahrscheinlichkeit, daß es *Az. agilis* in den anderen überwuchert hatte.

*Az. agilis* wurde von allen anderen Autoren immer in Abwasserkanälen und Entwässerungsanlagen gefunden. Um zu klären, ob das Vorkommen dieses Organismus an bestimmte Bedingungen gebunden ist, wurden daher aus 14 verschiedenen Gewässern in 4 wöchigem Abstand je 2 Proben entnommen und je ein Kolben mit Nährlösung, mit und ohne Agar-zusatz, und 2 Platten beimpft. Die Anreicherungen wurden dann zu verschiedenen Zeiten makroskopisch und mikroskopisch untersucht und

Tabelle 2. Vorkommen von *Azotobacter* in 14 verschiedenen Gewässern in der Nähe Göttingens.

Die 2. Spalte gibt das Vorkommen von *Az. chroococcum* an, die 3. das von *Az. agilis*. Die 4. Spalte zeigt die topographische Lage zu Göttingen, die 6., ob das Gewässer direkt von Kulturland umgeben ist.

1	2	3	4	5	6	7
Gewässer	<i>Az. chroococcum</i>	<i>Az. agilis</i>	Lage	Ver-schmut-zung	Kultur-land	Bemerkungen
Seeburger See ..	+	+	17 km NO	+	+	Von Schilf und Wiesen umgeben, eutroph.
Kiesgrube .....	+	+	3 km S	+	+	Großes Gewässer, künstl. Ursprung.
Lehmkuhle: Rosdorfer Str. ..	+	—	3 km S	+	+	Kleiner Tümpel, sehr klares, bewachsenes Wasser.
Rosdorfer Teich ..	—	—	4 km SW	+	—	Großer sauberer Fischteich, Wiesen durch Weg abgetrennt.
Grone: Quellwasser ...	—	—	4 km W	—	—	Quelle gefaßt.
Springmühlenteich .....	—	—	4 km W	+	+	Wasser direkt aus der Gronequelle kommend.
Leine (Fluß) ....	+	—	2 km NW	++	+	Außenbezirk von Göttingen.
Tümpel: Bismarckturm/ Hainholzhof ...	—	—	3 km O	++	—	Fichtenwald, Wasserlinsen.
Tümpel: Göttingen/ Herberhausen ..	+	—	3 km O	++	+	Zeitweise trockenliegend, Waldwiese.
Tümpel: Nähe Herberhausen .....	+	—	3 km O	++	+	Meist ausgetrocknet, stark bewachsen, Viehweide.
Teich: Bahnhofsanlagen .....	+	—	Gttg.	++	+	Wasserlinsen.
Schwanenteich ..	+	—	Gttg.	+++	+	Faulschlammreich.
Botanischer Garten .....	+	—	Gttg.	++	+	Bewachsen.
Schloßteich Gieboldehausen	+	—	22 km NO	+	—	Wasserlinsen, Wald, Wiesen-nähe.



verschiedenen Passagen unterworfen, bis einwandfrei festgestellt werden konnte, um welchen Organismus es sich handelte.

Aus der Tabelle geht hervor, daß *Az. agilis* nur in den beiden größten Gewässern, dem Seeburger See und der Kiesgrube bei Göttingen gefunden wurde. Beide sind wenig verschmutzt, stehen jedoch in Verbindung mit verunreinigten Gewässern. Aus der Leine, in die direkt Abwässerkanäle münden, wurde es nicht isoliert, aus den stark verschmutzten Tümpeln ebenfalls nicht. Ob es jedoch hier durch andere *Azotobacter*-Arten unterdrückt wurde, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. *Az. chroococcum* kam in allen von Kulturland umgebenen, älteren Gewässern vor, war jedoch dort nie durch Platten, sondern nur durch Anreicherungskulturen zu erfassen. Dies ist ein Zeichen dafür, daß die Konzentration von *Az. chroococcum* in Gewässern wesentlich kleiner ist als in der angrenzenden Erde. Ob diese Organismen wassereigen sind (PRAZMOWSKI: Salzmeere) oder zufällig von außen hineingekommen sind und sich vermehren, kann nicht festgestellt werden; die Frage ist auch ohne Bedeutung.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß *Az. agilis* wesentlich verbreiteter ist, als allgemein angenommen wird und nur wegen der schwierigen Züchtung auf Kulturmedium so selten gefunden wurde. Es sei noch erwähnt, daß NICOL, der während eines siebentägigen Aufenthaltes in Nordengland mehrere Gewässer auf *Az. agilis* untersuchte, dieses nur in der am letzten Tage entnommenen Probe fand. Es liegt nahe, daß *Az. agilis* bei den älteren Anreicherungen (wie wahrscheinlich bei den meisten Probeentnahmen vom Seeburger See) durch ungünstige Bedingungen in den Gefäßen bereits von *Az. chroococcum*, das in allen Proben gefunden wurde, überwuchert war und daher von NICOL nur aus der letzten Probe isoliert werden konnte.

BAIER stellte fest, daß die Vermehrung der *Azotobacter*-Arten in Gewässern vom teichwirtschaftlichen Standpunkt aus wesentlich ist und erwähnt den Vorschlag HOFERS, die Tätigkeit der stickstoffbindenden Bakterien durch Kohlenhydratdüngung anzuregen. Somit könnten die Schwierigkeiten bei mineralischer Düngung (sofortiger Eintritt der Denitrifikation vor dem Umsatz in organische Substanz) umgangen werden. Er erwähnt in diesem Zusammenhang die Notwendigkeit, die natürlichen Existenzbedingungen der *Azotobacter*-Arten kennenzulernen.

### Zusammenfassung.

Das Vorkommen von *Azotobacter agilis* wurde in der Umgebung von Göttingen in 2 größeren wenig verschmutzten Gewässern (Seeburger See, Kiesgrube) nachgewiesen, nicht dagegen in reinen Quellteichen und in stark verschmutzten Gewässern. Die selten gelungene Isolierung dieses Organismus ist wohl auf eine Überwucherung durch *Az. chroococcum* zurückzuführen.

## Literatur.

BAIER, K. R.: Arch. f. Hydrobiol. **29**, 183 (1935). — BEIJERINCK, M. W.: Zbl. Bakter. II **7**, 561 (1901). — FISCHER, W.: Arch. f. Mikrobiol. **14**, 353 (1949). — KAYSER, E.: Comptes rend. de l'Acad. Sc. Paris **171**, 969 (1920); **172**, 183, 491, 939 (1921). — KLUYVER, A., u. VAN REENEN, W. J.: Arch. f. Mikrobiol. **4**, 280 (1933). — KLUYVER, A., u. VAN DEN BOUT, M. T.: Arch. f. Mikrobiol. **7**, 261 (1936). — NICOL, H.: Microbes by the Million, Penguin Books — Harmondsworth Middlesex England (1945), 161. — PRAZMOWSKI, A.: Azotobacterstudien I, Morphologie und Physiologie, Zbl. Bakter. II **33**, 292 (1912). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie, Berlin und Göttingen: Springer 1947.

Nachtrag: Inzwischen wurde mir bekannt, daß *Azotobacter agilis* auch in 25% der Gewässer um Madison, Wisconsin und San Franzisko (Kalifornien) und in 75% der Gewässer um Buenos Aires (Argentinien) gefunden wurde: S. SORIANO: Rev. inst. bact. dept. nacl. hig. (Buenos Aires) **10**, 55 (1941).

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule in Karlsruhe.

## Biologische und stoffwechselphysiologische Studien an Myxococcaceen.

Von

GERTRUD FINCK.

Mit 27 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. November 1949.)

Von einer eingehenden historischen Darstellung unserer Kenntnisse über die Myxobakterien glaube ich absehen zu können, da sie bereits durch JAHN (1924) in bis dahin erschöpfender Weise gegeben worden ist.

Angefangen von THAXTER (1892, 1897, 1904) über BAUR (1904), QUEHL (1906), VAHLE (1909), KOFLER (1913) bis JAHN (1901, 1924, 1936) befassen sich die Beobachtungen fast ausnahmslos nur mit der beschreibenden Darstellung des Entwicklungsganges und den systematischen Verhältnissen der Myxobakterien, während die biologische und stoffwechselphysiologische Erforschung sehr stark vernachlässigt blieb. H. und S. KRZEMIENIEWSKI ließen zahlreiche Veröffentlichungen (1926, 1927, 1930) über die Verbreitung der Myxobakterien folgen. Doch im Laufe ihrer Untersuchungen wandten sie sich mehr stoffwechselphysiologischen Beobachtungen zu, über die sie bereits 1937 berichteten. Sie bestätigen darin die Fähigkeit der Celluloseverwertung gewisser Myxobakterien und den Nährwert verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen.

Im weiteren Verlauf sind noch die Arbeiten von BADIAN (1930, 1933) und MILOVIDOV (1930) zu erwähnen, in denen versucht wird, die Kernverhältnisse in der Myxobakterienzelle aufzuklären. Über die Orientierung des vegetativen Schwarmes und die Fruchtkörperbildung sowie über die Beziehungen zwischen Myxobakterien und *Cytophaga*-Arten hat STANIER (1942, 1944, 1947) Veröffentlichungen herausgegeben.

Wesentlich neue Erkenntnisse hat uns KÜHLWEIN (1950) vermittelt. Seine Untersuchungen galten in erster Linie der Aufklärung des Kohlenhydrat- und Stickstoffstoffwechsels bei *Myxococcaceen*, der gegenseitigen Abhängigkeit beider voneinander und dem Nachweis der symbiontischen Lebensweise von *Chondromyces crocatus*, einer hochdifferenzierten Myxobakterienart.

Meine Aufgabe bestand nun darin, die Befunde KÜHLWEINS in ernährungsphysiologischer Hinsicht zu erweitern, wobei die Verwertung von Wuchsstoffen besonders berücksichtigt werden sollte. Auf der Suche nach geeigneten Stämmen ergaben sich auch Fragen systematischer Art, die, soweit es sich als nötig erwies, am Schlusse der Arbeit erörtert werden.

### A. Methodisches.

Gewinnung und Züchtung der Myxobakterien erfolgte nach Angaben früherer Autoren wie KOFLER, KRZEMIENIEWSKI und KÜHLWEIN. In verhältnismäßig kurzer

Zeit konnten danach sowohl aus frischen Wildmistarten wie aus Bodenproben und Erdaufschwemmungen verschiedener Herkunft zahlreiche Myxobakterien gewonnen werden, die teils identisch mit den schon früher beschriebenen Arten sind, teils auch neue Spezies darstellen. Sie gehören den Gattungen *Myxococcus* und *Chondromyces* an. Die beiden *Chondromyces*-Arten in Kultur zu bekommen, ist nicht geglückt, hingegen gelang ohne große Schwierigkeiten die Isolierung und Reinzüchtung der *Myxococcaceen*. Als Kulturmedium für Reinkulturen erwies sich Wildkaninchen- oder Mäusemist-Agar<sup>1</sup> und Lößerde-Agar<sup>2</sup> am geeignetsten, denn die stoffliche Zusammensetzung dieser Nährböden entspricht am ehesten den natürlichen Lebensbedingungen.

## B. Charakteristik der Versuchsorganismen.

In Tab. 1 ist nach den Erscheinungsformen in den Ausgangskulturen eine kurze morphologische Charakteristik derjenigen *Myxococcaceen* gegeben, die zur weiteren Bearbeitung ausgewählt wurden. Eine ausführliche Beschreibung und Identifizierung soll erst an die Betrachtung der stoffwechselphysiologischen Leistungen angeschlossen werden, da eine Artumgrenzung meines Erachtens erst auf Grund ihres physiologischen Verhaltens durchgeführt werden kann.

Die Reinkulturen dieser *Myxococcaceen*-Stämme wurden in Rattenmist- und Lößerdeagar bei  $p_H$  7 gezüchtet. Auf beiden Nährsubstraten vollzog sich, von einigen geringfügigen Abweichungen hinsichtlich ihrer morphologischen Erscheinungsform abgesehen, der normale vollständige Entwicklungsgang.

## C. Vergleichende stoffwechselphysiologische Untersuchungen.

Ausgehend von der Annahme, daß die Verarbeitung der Nährstoffe von der jeweiligen ökologischen Anpassung abhängen muß, führten H. und S. KRZEMIENIEWSKI (1937) bei zahlreichen Myxobakterien die ersten systematischen Versuche über die Verwertbarkeit der Cellulose aus. Einige Myxobakterien aus der Gruppe der *Sorangiaceen* wurden auch als Cellulosezerersetzer erkannt, doch der Großteil der gemeinen Myxobakterien scheint Cellulose nicht unmittelbar angreifen zu können. Man muß daher annehmen, daß für die meisten Myxobakterien andere Kohlenstoff- und bestimmte Stickstoffquellen, die im Boden und Mist von Pflanzenfressern enthalten sind, als Nährstoffe in Frage kommen.

### 1. C-Stoffwechsel.

#### a) Verwertbarkeit von reiner Glucose.

Verwendet wurde ein 1,5%iger Agarnährboden mit 0,5% Glucose. Um einheitlichen Substratwechsel zu erreichen, wurde der Glucose-Agar nur

<sup>1</sup> 10 g Wildkaninchenmist oder 5 g Mäuse- oder Rattenmist auf 500 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser, etwa 10 min gekocht, abfiltriert und 1,5% Agar zugesetzt.

<sup>2</sup> 5 g Lößerde + 500 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser unter öfterem Schütteln 24 Std stehen gelassen, hernach abfiltriert und mit 1,5% Agar versetzt.



Tabelle 1. Übersicht über die zu den Untersuchungen benutzten Myxococcaceen.

Art	Sporen- größe	Stäbchen- größe	Fruchtkörper	Besondere Merkmale	Fundort
1. <i>Myxococcus rubescens</i> Thaxter	1,3—1,6 $\mu$ $\emptyset$	5,2—7,8 $\mu$ lang, etwa 1 $\mu$ breit.	normal	—	aus Gartenerde Karlsruhe.
2. <i>Myxococcus albus</i> (von JAHN u. KÜHLWEIN als Varietät bezeichnet)	2—2,5 $\mu$ $\emptyset$	6,5—9,1 $\mu$ lang, etwa gestreckte Form, 1,2 $\mu$ breit	ziemlich runde bis lang- gestreckte wulstige Form, teils mehrere Frk. zus. ge- laufen; Farbe milchig cre- mefarben, glasiges Aussehen	Frk. in Wasser leicht zer- fließlich.	aus Löß- u. Essexit-haltiger Erde des Kaiserstuhls.
3. <i>Myxococcus virescens</i> Thaxter	2—2,2 $\mu$ $\emptyset$	5,2—7,8 $\mu$ lang, 1—1,2 $\mu$ breit	normal	—	von Schafnist aus Albtal/ Karlsruhe.
4. <i>M. vipereus</i> n. sp.	2 $\mu \emptyset$	6,5—7,8 $\mu$ lang, 1—1,3 $\mu$ breit	keulig oder wulstig ge- schlängelt, gekrüppeltes, glänzendes Aussehen von leuchtend gelber bis kupfer- roter Farbe. Einzelne Frk. zum Teil gelb bis orange geflammt.	In dicker zäher Schleim- hülle der Frk. noch normale Stäbchen vorhanden.	aus Weinbergboden Wasen- weiler/Kaiserstuhl.
5. <i>M. cerebriiformis</i> Kofler	2—2,6 $\mu$ lang, etwa 1,3 $\mu$ breit, rund bis oval	5,2—12 $\mu$ lang, 0,7—1 $\mu$ breit	siehe KOFLER	—	aus Lößerde Wasenweiler/ Kaiserstuhl.

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Art	Sporen- größe	Stäbchen- größe	Fruchtkörper	Besondere Merkmale	Fundort
6. <i>M. brevipes</i> n. sp.	1,3—1,8 $\mu$ $\emptyset$ , Sporen unregelm.	5,2—6,5 $\mu$ lang, 1—1,3 $\mu$ breit	aus wulstigem, leistenarti- gem, weißlichem bis gelb- lichem zus.hängendem Schleimfuß (etwa 70 bis 110 $\mu$ $\emptyset$ ), auf den schwach gestielte, deutlich abge- setzte orangerote bis leuch- tend rote Einzelleysten auf- gesetzt sind.	Fuß besteht aus Stäbchen; von Wildkaninchenmist er verschwindet beim Älter- werden der Frk.	von Wildkaninchenmist Endingen/Kaiserstuhl.
7. Form <i>H</i> n. sp.	2—2,6 $\mu$ lang, etwa 2 $\mu$ breit, unregel- mäßig ge- formt.	6,5—8 $\mu$ lang, 1 $\mu$ breit	geschlossenes Auftreten be- ruht auf einem gelblichen, zus.hängenden, höckerigen Schleimfuß auf der Boden- oberfläche, der sich mit der Impfnadel etwas aus d. Sub- strat herausheben läßt. Auf den Höckern entstehen gel- be bis gelbrosa unregelmä- ßig geformte cystenartige Frk.	Frk.masse zerfließt leicht.	aus Essexit-haltiger Erde vom Kaiserstuhl.
8. <i>M. polycystus</i> Kofler	1,5—1,8 $\mu$ $\emptyset$	6,5—13 $\mu$ lang, 0,8—1 $\mu$ breit	wulstige unregelmäßige, teils stark kryptartige Form, etwa 340 $\mu$ breit, von zart- rosa bis violettrosa-gelb- licher Farbe. Glasiges Aus- sehen.	—	von Rehlosung Hochmoor/ Schwarzwald.

aus Rattenmistagar-Reinkulturen beimpft und bei etwa 30° im Thermostat bebrütet. Aus dem Ergebnis dieser Versuchsserie lassen sich zusammenfassend folgende Merkmale herausheben:

Das vegetative Wachstum war bei allen Stämmen gut mit Ausnahme von *M. virescens*, der überhaupt nicht anging, und *M. polycistus*, der sich auffallend gehemmt entwickelte. Fruchtkörper bildeten sich reichlich bei *M. cerebriiformis* und Form H, in geringerer Menge bei *M. albus*, ohne Fruktifikation blieb *M. rubescens* (Abb. 1). In den meisten Kulturen

traten abgeänderte Fruchtkörperformen und keine Farbstoffbildung auf, mit Ausnahme von *M. cerebriiformis*, dessen Fruchtkörper normal beige gefärbt waren und teilweise ihre gehirnnähnliche cystenartige Prägung behielten.



Abb. 1.



Abb. 2.

Abb. 1. *M. rubescens* auf Glucose-Agar, Wachstum der veg. Schwärmstäbchen in wirbelartigen Schleimbahnen. Vergr. 500fach.

Abb. 2. *M. brevipes* auf Glucose-Agar, verkürzte und verdickte Schwärmstäbchen. Vergr. 450fach.

Ein vollkommen verändertes Bild gab das Schwarmwachstum von *M. brevipes*. Die geringe Ausbreitung seines Schwarmes wurde wohl dadurch hervorgerufen, daß sich die vegetativen Stäbchen in der Vermehrungsphase sofort stark verdickten und verkürzten bis zur Kokkenform (Abb. 2). Auffallend ist die damit verbundene Größenzunahme der Einzelindividuen. Zur Prüfung der Frage, ob es sich dabei um eine Dauermodifikation oder lediglich um eine formative Veränderung durch unmittelbare Glucoseeinwirkung handelt, wurden diese abgeänderten Stäbchen-Kokken auf Rattenmistagar übergeimpft. Hier ging die Größenzunahme und Formveränderung spontan zurück, es erfolgte völlig normales vegetatives und fruktifikatives Wachstum. Diese rein formative Veränderung war auch noch bei *M. cerebriiformis* und *M. viperus*, jedoch erst nach 10—17 tägiger Kulturdauer, zu bemerken, weshalb es möglich ist, daß dieser Verkürzungsvorgang nicht unmittelbar von der Glucosewirkung, sondern eher von einer sonstigen Substratveränderung abhängt.

Hervorzuheben ist noch die Tatsache, daß dieselben Myxobakterienstämme auf dasselbe Substrat nicht einheitlich anzusprechen scheinen. KÜHLWEIN (1947) fand bei *M. rubescens* nach Übertragung von Mäusemist- auf Glucoseagar gutes vegetatives und fruktifikatives Wachstum, während in meinen Versuchen keine Fruktifikation eintrat. *M. virescens* zeigte bei KÜHLWEIN noch geringes vegetatives Wachstum; hier unterblieb es völlig.

## 2. N-Stoffwechsel.

Bei den bisher von KÜHLWEIN (1947) und KRZEMIENIEWSKI (1936) erprobten Stickstoffnährböden ergab sich, daß sowohl anorganisch wie auch organisch gebundener Stickstoff von den Myxobakterien verarbeitet werden kann, wobei gerade unter den *Myxococcaceen*-Arten ein gewisses Spezialistentum entwickelt zu sein scheint. Für *M. rubescens* gibt KÜHLWEIN für anorganische wie organische Stickstoffverbindungen einen gleichmäßig guten Nährwert an, während bei *M. virescens* das Wachstum durch mineralischen Stickstoff sichtlich gehemmt sein soll.

### a) Prüfung auf Nitratreduktion.

Die Versuche wurden in Wildkaninchenmist-Brühe (10 g Wildkaninchenmist auf 500 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser) mit einem Zusatz von 0,1% KNO<sub>3</sub> vorgenommen. Die beimpften Kulturen wurden bei 30° C bebrütet und am 3., 5. und 8. Tag geprüft. Der Nachweis der Nitritbildung wurde durch Zusatz von einigen Tropfen  $\alpha$ -Naphthylaminlösung + einigen Tropfen Sulfanilsäurelösung (bei positivem Befund Rotfärbung) erbracht. Die mit *M. rubescens* und *M. brevipes* beimpften Nährlösungen zeigten an allen 3 Kontrolltagen schwache Rotfärbung, während die Kulturflüssigkeiten von *M. albus* und *M. virescens* erst am 2. und 3. Kontrolltag sehr schwache Rötung ergaben. In den unbeimpften Kontrollnährlösungen und bei allen anderen Stämmen verlief die Reaktion negativ. Da diese Farbstoffbildung eine sehr empfindliche Reaktion darstellt, ist anzunehmen, daß das Reduktionsvermögen zu Nitrit bei diesen *Myxococcaceen* sehr gering ist. Andererseits ist auch möglich, daß die Reduktion gleich weiter zu Ammoniak verlaufen ist, während Denitrifikation zu elementarem Stickstoff recht unwahrscheinlich ist. Jedenfalls beweist das verhältnismäßig gute vegetative und fruktifikative Wachstum, daß der Nitrat-Stickstoff für ihren Baustoffwechsel ausgezeichnet verwertbar ist. *M. virescens*, *M. cerebriformis*, *M. brevipes* und *M. albus* gingen in dieser Wildkaninchenmist-Nitratbrühe zu vermehrter Fruchtkörperbildung über, wobei sich die Fruchtkörper teils völlig normal, jedoch farblos, teils nur als unregelmäßige Schleimfetzen am Boden des Kulturgefäßes entwickelten. Diese Erscheinung, über die auch schon BAUR und KOFER berichten, ist wegen der sonst so stark aeroben Lebensweise der Myxobakterien nicht ganz begreiflich. Es wäre daher sicher lohnend, das Sauerstoffbedürfnis der Myxobakterien zu erforschen.

### b) Wachstum auf Pepton-Agar.

Als sehr konstantes und bezeichnendes Merkmal erwies sich das Verhalten der *Myxococcaceen* auf Peptonnährböden, worauf schon BAUR und



JAHN hingewiesen haben. Als Nährmedium diente ein 1,5% iger Agar, der Witte-Pepton 1% ig und NaCl 0,5% ig enthielt.

Alle *Myxococcaceen*-Arten, mit Ausnahme von *M. rubescens* und *M. brevipes* wurden im Wachstum deutlich gefördert. Der Schwarm erstreckte sich sogar bei *M. virescens* schon nach 5 tägiger Bebrütung über die ganze PETRISchale. Die wachstumssteigernde Wirkung beschränkte sich allerdings in allen Kulturen einseitig auf die vegetative Phase, während die Fruktifikation völlig unterdrückt blieb. Für die vegetative Phase ergab sich dabei formativ eine Umgestaltung, die zu völlig verändertem Aussehen führte und wie folgt verlief: In allen

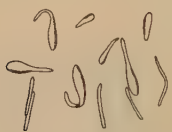


Abb. 3.



Abb. 4.

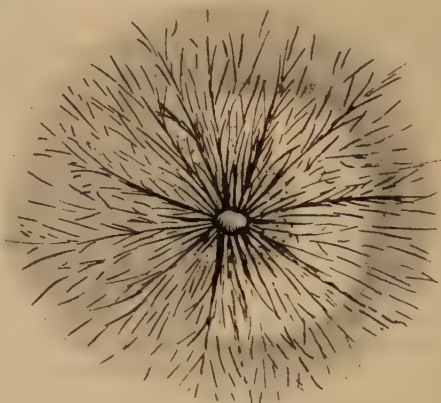


Abb. 5.

Abb. 3. *M. viperus* auf Pepton-Agar, aufgeblasene veränderte Formen. Vergr. 1500fach.

Abb. 4. *M. polycistus*, Erscheinungsbild d. Schwarmbereichs auf Pepton-Agar. Nat. Größe.

Abb. 5. *M. brevipes*, desgl. Nat. Größe.

Kulturen bildete sich sofort in regelmäßiger Anordnung eine ziemlich gleichmäßig dicke Haut, die sich zu einem äußerst zähen, mehr oder weniger gefalteten, meist einheitlich gefärbten Schleimbelag entwickelte, in dem im allgemeinen stark vergrößerte und aufgeblasene vegetative Stäbchen so dicht zusammengelagert waren, daß sie erst beim Zerquetschen des Agars erkannt werden konnten (Abb. 3). Die äußere Prägung der Schleimhaut und deren farbliche Merkmale erwiesen sich als so artspezifisch verschieden und konstant, daß sie zur systematischen Diagnose herangezogen werden können (Abb. 4, 5, 6, 7). Hervorzuheben ist noch, daß in diesem Peptonsubstrat die gelben, grünlichen und beigen Farbstoffe sehr stark in Erscheinung traten, während die roten Farbstoffe, die *M. rubescens* und *M. brevipes* eigen sind, nicht oder nur sehr schwach gebildet

wurden. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine hohe ernährungsphysiologische Wirkung des Peptons auf diese *Myxococcaceen* unverkennbar vorhanden ist. Doch ist die hier angewandte Konzentration sicher zu hoch, denn die Schwarmstäbchen zeigten schon nach 9- bis 10-tägiger Kulturdauer unter Aufblähung und starker Nährstoffspeicherung im Plasma als Zeichen von Überfütterung Autolyse, obwohl andererseits in sieben aufeinanderfolgenden Passagen bei rechtzeitiger Übertragung keine Gewöhnung an das Substrat und keine Verringerung der Wachstums- und Teilungsintensität zu erkennen war.

Es erhebt sich nun noch die Frage, ob das Ausbleiben der Sporenbildung und der Fruktifikation von der Art oder der Menge

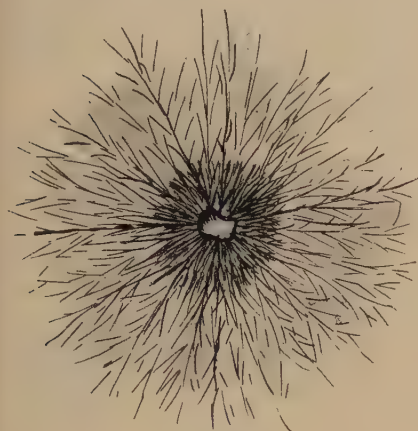


Abb. 6.

Abb. 6. *M. virescens*, Erscheinungsbild d. Schwarmbereichs auf Pepton-Agar. Nat. Größe.

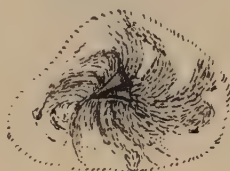


Abb. 7.

Abb. 7. *M. viperus*, desgl. Nat. Größe.

der N-Komponente abhängig ist, oder ob es lediglich durch die Folgen der Überfütterung zustande kommt, die ihrerseits eine so rasche Autolyse veranlaßt, daß es nicht zu einer Sporulation kommen kann. Zur Lösung dieses Problems können die folgenden Versuche beitragen, in denen zur Eiweißquelle noch ein Kohlenhydrat im Nährmedium gereicht wurde.

### 3. C-N-Stoffwechsel gekoppelt.

#### a) Wachstum auf Bromthymolblau-Nährboden.

Diese Versuchsserie wurde so angelegt, daß sie nach mehreren Gesichtspunkten ausgewertet werden konnte. Einmal diente dieser Bromthymolblau-nährboden<sup>1</sup> zum Nachweis der Säurebildung und zur Beurteilung des pH-Wertes, zum anderen wurde das Verhältnis Pepton-C-Quelle behandelt. Als vergärbare Zucker wurde Glucose in Höhe von 0,5% gewählt unter Hinzufügung von Witte-Pepton im selben Mengenverhältnis, wobei aber zu bemerken ist, daß der N-Gehalt nicht im selben Verhältnis

<sup>1</sup> Rezept siehe HABS, Bakteriologisches Taschenbuch.

zur C-Menge steht. Der pH-Bereich von Bromthymolblau erstreckt sich zwischen 6,0 und 7,6 mit einem Farbumschlag von gelb zu blau. Der Nährboden wurde auf den Neutralpunkt = grün eingestellt, die Sterilisation verursachte eine schwache Alkalisierung. Nach 10tägiger Kulturdauer hatte sich bei allen 8 *Myxococcaceen*-Stämmen die Wasserstoffionenkonzentration in gleicher Höhe = schwach alkalisch mit grün-blauer Farbe gehalten. Es wurden auch keine weiteren Veränderungen im Substrat wahrgenommen, so daß man annehmen kann, daß diese *Myxococcaceen* nicht befähigt sind, in ihrem Kohlenhydratstoffwechsel Milchsäure zu bilden.

In Pepton + Glucose im Verhältnis 1 : 1 war das Wachstum aller 8

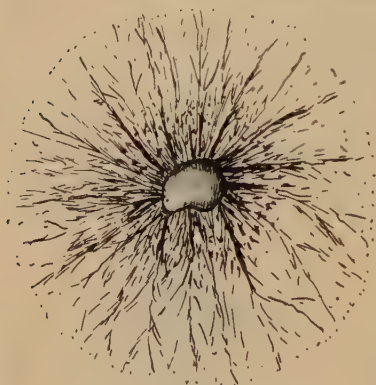


Abb. 8.

Abb. 8. *M. rubescens*, Erscheinungsbild d. Schwarmbereichs auf Pepton-Agar. Nat. Größe.

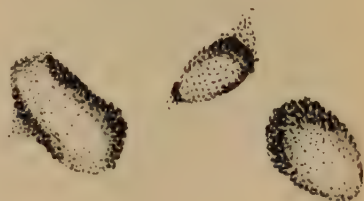


Abb. 9.

Abb. 9. *M. virescens*, Einzelfruchtkörper auf Bromthymolblau-nährboden. Vergr. 66fach.

Stämme besser als bei 1% igem Pepton. Ja, die vegetative Phase schien sogar noch mehr gefördert bei gleichzeitigen mehr oder weniger starken Anreizen zur Fruktifikation und Kokkenbildung (Abb. 8, 9). Zur Verkürzung der Stäbchen und Kokkenbildung im Schwarmbereich ohne gleichzeitige Fruchtkörperbildung kam es bei *M. polycistus* und *M. albus*; riefige, papillenartige Schleimerhöhungen aus Stäbchenkonzentrationen fanden sich bei *M. rubescens*, *M. viperus* und *M. cerebriiformis*, während bei *M. virescens* und Form H die vegetative Vermehrung und Fruktifikation mit Kokkenbildung gleichzeitig die höchste Förderung erfuhr. Aus diesen Feststellungen geht eindeutig hervor, daß der Anreiz zur Verkürzung der Stäbchen und Sporulation unabhängig von der Fruchtkörperbildung erfolgt, und daß andererseits auch die erhöhte Schleimproduktion, die zu fruchtkörperähnlichen Gebilden führen kann, keinen Einfluß auf die Kokkenbildung ausübt. Es läßt sich schwer übersehen, ob hier der Kohlenstoff in Form von Glucose die Fruktifikation teilweise so günstig beeinflußt hat — was zwar nach früheren Ergebnissen nicht angenommen werden kann — oder ob die geringere Peptongabe die Über-

fütterung verhinderte und damit eine Sporulation vor der autolytischen Zersetzung möglich machte. Eine Klärung können erst weitere Versuchsserien, in denen Pepton und Glucose in abgestuften Mengen erprobt werden, ergeben.

Als letztes verdient noch erwähnt zu werden, daß auf diesem Pepton-Glucosesubstrat dieselben Stämme eine stärkere Farbstoffbildung aufwiesen, als auf reinem Peptonagar, was als Beweis dafür angesehen werden kann, daß die Bildung des Farbstoffes durch Glucose nicht unmittelbar beeinflußt wird.

#### b) Prüfung auf Gelatineverflüssigung.

In Hefegelatine-Plattenkulturen und in Mistgelatine-Stichkulturen erwiesen sich alle Versuchsstämme als Eiweißverflüssiger. Hervorzuheben ist dabei, daß die Bakterienentwicklung entsprechend den KÜHLWEINschen Angaben nur rein vegetativer Art war mit Ausnahme von *M. brevipes*, der in beiden Versuchsserien wenige blaßrote, stark verschwommene Fruchtkörper erkennen ließ. In der Hefegelatine, die Hefe- und Gelatine-eiweiß enthält, waren um den Verflüssigungsherd bei *M. albus* und *M. brevipes* außerdem deutliche Klärungshöfe sichtbar, die darauf schließen lassen, daß bei diesen Arten auch das Hefeeiweiß fermentativ abgebaut und mitverdaut wurde.

#### c) Wachstum auf Hefenährböden.

100 g frische Bäckerhefe wurden mit 1000 cm<sup>3</sup> aqua dest. etwa 2 Std im Dampftopf erhitzt, nach längerem Absitzen mehrmals filtriert, mit 1,5% Agar versetzt und auf pH 7 eingestellt. Diese Hefebrühe wurde auch teilweise in der Verdünnung 2 : 1 mit aqua dest. und 1 : 1 mit Wildkaninchenmistbrühe + Agarzusatz verwendet. Ihr wirksames Prinzip ist einmal in dem Hefeeiweiß, -fett, und -glykogen, sowie in den Hefewuchsstoffen zu suchen.

Entsprechend dieser quantitativ wie qualitativ reichhaltigen Nährstoffgabe entfaltete sich auch das Erscheinungsbild der *Myxococcaceen* derart vielgestaltig, daß es eine ausführliche Beschreibung nötig macht. Allen 8 *Myxococcaceen*-Arten gemeinsam war sehr gesteigertes vegetatives Wachstum, das bei *M. rubescens*, *M. virescens* und *M. viperus* die einzige Vermehrungsform blieb. *M. brevipes*, Form H und *M. polycistus* gingen erst im Laufe 12—20-tägiger Kulturzeit zu mehr oder weniger starken Stäbchenverkürzungen und zur Sporulation in variierten Fruchtkörpergebilden über, die noch näher erläutert werden sollen. Nur bei *M. cerebriiformis* und in geringerem Maße bei *M. albus* ging sofort neben einer intensiven vegetativen Vermehrung gesteigerte, mit Kokkenbildung verbundene Fruktifikation einher, die bei *M. cerebriiformis* sogar völlig natürliche, geweihähnliche Fruchtkörperformen prägte, bei *M. albus* hin-



gegen nur in flachen, zerlaufen erscheinenden Hügeln zum Ausdruck kam. Als besondere Abweichung ist zu erwähnen, daß bei Form *H* neben atypischen, aus Kokken bestehenden Fruchtkörpern noch im ganzen Schwarmbereich regellos zerstreute Kokken auftraten. Aus dieser Fülle der Hefeerscheinungen kann als einheitliches Merkmal nur die Verzögerung der Kokkenbildung und die damit meist verbundene modifizierte Fruktifikation angesehen werden.

Die Beobachtungen zeigen erneut, daß Kokken- und Fruchtkörperbildung nicht unbedingt gekoppelt zu sein brauchen und daß jeder Vorgang unabhängig vom anderen ablaufen kann. Ebenso darf man an-

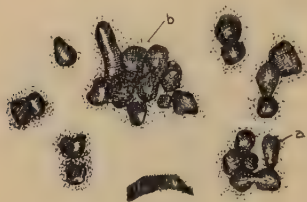


Abb. 10. *M. albus* auf Hefe-Agar, unregelmäßig gestaltete amöboide Formen. Vergr. 1800 fach.

nehmen, daß die Schleimsubstanz und auch die vegetativen Stäbchen so viel gestaltende Elemente besitzen, daß aus beiden gemeinsam ein differenzierter, fast normal geformter Fruchtkörper entstehen kann, in dem dann erst sekundär, unabhängig vom ersten Vorgang (hier nach mehr als zweiwöchiger Kulturzeit) ein allmählicher Übergang zur Sporenbildung erfolgt. Welches die Ursache der Sporulation ist, ob hierfür Alterserscheinungen,

Kontaktreize, enzymatische oder sexuelle Vorgänge in Frage kommen, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Als sonstige für Hefeagar spezifische Erscheinung ist noch die erhöhte Schleim- und Farbstoffbildung zu nennen, die sich einmal in der viel intensiveren Leuchtkraft der einzelnen Farbstoffe, zum anderen in der Fluoreszenz fast aller Kulturen äußerte. Auch ein Farbumschlag von gelb bis gelbgrün nach intensiv rot konnte in *M. vipeus*- und *M. polycistus*-Kulturen bei Umstellung vom dunklen Thermostat ans Sonnenlicht wahrgenommen werden, wobei dann nach mehrtägiger Aufstellung im Tageslicht der Farbstoff allmählich verblaßte.

Als Besonderheit im Wachstum auf Hefeagar kann die teilweise starke Vergrößerung der Stäbchen und Kokken angesehen werden, die sich z. B. bei *M. cerebriformis* und *M. albus* in ziemlich unregelmäßig geformten Gebilden zwischen 2,6—6,5  $\mu$  Länge und 2—2,8  $\mu$  Breite äußerte (Abb. 10) und den Eindruck von amöboiden, zu einem Mosaik zusammengelegerten Individuen hinterläßt.

Diese Beobachtung führt zur Frage nach dem Vorhandensein einer Zellhaut, die bei den meisten bisherigen Autoren Gegenstand ausführlicher Diskussionen war. VAHLE (1909) ist der Ansicht, daß Myxobakterien nur von einer Pellicula umgeben sind. JAHN (1924) nimmt dagegen die Anwesenheit von besonderen, wenn auch zarten plasmatischen Membranen an. KRZEMIENIEWSKI (1927) lehnt hingegen das Bestehen einer Zellmembran auf Grund naheliegender Erwägungen ab. Diese ver-

schiedenen Anschauungen stützen sich hauptsächlich auf mittelbare Beweise, weil unmittelbare Argumente, die für oder gegen das Vorhandensein einer Membran sprechen, nicht existieren. Eine Entscheidung darüber ist schwierig. Wenn man diese unregelmäßig geformten und gequollenen Übergangsformen in Fruchtkörperanhäufungen betrachtet, wird man das Vorhandensein einer festen Zellhaut ablehnen. Dafür spricht ferner noch folgendes: In alten *Myxobakterienkulturen* sind Zellaggregate im Zustande der Desorganisation zu finden, deren Zellen ihre deutlichen Umrisse verloren haben und in eine gestaltlose, körnige Masse übergegangen sind, in der noch Fett-Tropfen und andere Granulationen der normalen Zellen unterschieden werden können, jedoch niemals leere Zellhäute. Oder sollte man annehmen, daß diese bei der Autolyse zu allererst aufgelöst werden?

Ferner ist noch bemerkenswert, daß sich bei keiner *Myxobakterienart* innerhalb mehrerer aufeinanderfolgender Hefepassagen — bei *M. brevipex* während 13 fortlaufender Passagen — weder eine Verringerung der Wachstumsintensität, noch eine Änderung in der substrattypischen Wuchsform, also keine „Nährbodenmüdigkeit“ bemerkbar machte. Auch traten trotz der quantitativ hohen Hefegabe autolytische Vorgänge erst nach längerer Kulturzeit auf. Weder in der Verdünnung der Ausgangsstammlösung 2 : 1 mit destilliertem Wasser, noch in 1 : 1 mit Wildkaninchenmistbrühe war in der vegetativen Phase ein Unterschied zu erkennen; in der fruktifikativen Phase stellte sich lediglich die Neigung zur Sporulation um einige Tage früher ein, als auf dem unverdünnten Hefe-Substrat.

Bei der Vielfalt der zum Teil extremen Erscheinungsformen, die das Hefesubstrat bewirkt, ist es schwierig festzustellen, welche Verbindungen oder Stoffgruppen als wirksame Komponente angesprochen werden können. Zunächst mußte an organische Wirkstoffe gedacht werden, die ja in reichem Maße von der Hefezelle gebildet und im Plasma gespeichert werden. Um ihre diesbezügliche Wirkung näher zu erforschen, schien es nötig, die spezifische Verwertbarkeit einzelner chemisch reiner Wuchsstoffe einer eingehenden Prüfung zu unterziehen.

Zunächst wurde Nikotinsäureamid geprüft, das damals als einziger Wuchsstoff zur Verfügung stand und in Höhe von 1 mg und 0,5 mg pro 1000 cm<sup>3</sup> 1,5%igem reinem Agar zugesetzt wurde. Im Verlauf der Untersuchung ließ sich bei den meisten darauf kultivierten *Myxococcaceen*-Arten eine etwas hemmende, ja zum Teil ausgesprochen toxische Wirkung erkennen, auf die an anderer Stelle noch näher eingegangen werden soll. Später wurde dann die Wirksamkeit von Aminosäuren untersucht, die nach MÖLLER (1941) als Aktivatoren tätig sind. Für das Milchsäurebakterium *Streptobacterium plantarum* sind Glutaminsäure, Leucin, Valin, Asparaginsäure, Isoleucin und Methionin nach MÖLLER unbedingt erforderlich; während Cystin, Tryptophan, Phenylalanin und Alanin schwankende Zu- und Anwachseffekte haben.

Um zu prüfen, ob eine ähnliche Abhängigkeit auch für die *Myxobakterien* zutrifft, wurden in den folgenden Versuchen zunächst einzelne Aminosäuren allein und dann zusammen unter Hinzufügung verschiedener Wuchsstoffe geboten.

d) Wachstum auf Glucose + Aminosäuren.

Die Verwertbarkeit verschiedener Aminosäuren wurde in zahlreichen Versuchsserien an den 8 *Myxococcaceen*-Arten geprüft. Als Nährmedium diente 1,5% iger Agar + 0,5% reine Glucose als gleichbleibende C-Quelle unter jeweiliger Hinzufügung von Asparaginsäure (0,1 mg/10 cm<sup>3</sup>), Glutaminsäure-hydrochlorid (0,5 mg/10 cm<sup>3</sup>), Leucin (0,2 mg/10 cm<sup>3</sup>),

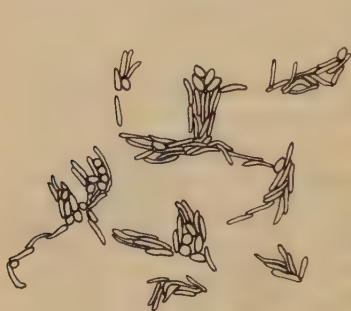


Abb. 11.

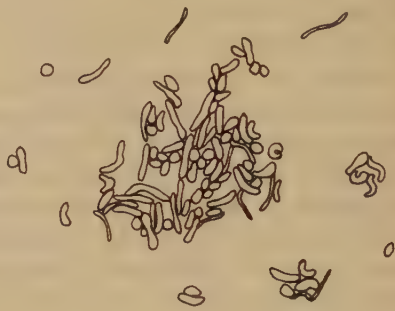


Abb. 12.



Abb. 13.

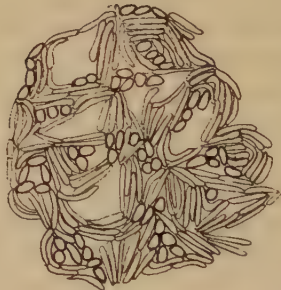


Abb. 14.

Abb. 11. *M. cerebriiformis* auf Glucose-Glutaminsäure-Agar. Vergr. 460 fach.

Abb. 12. *M. polycistus* auf Glucose-Asparagin-Agar. Vergr. 460 fach.

Abb. 13. Form H, Häufchen spiraliger Stäbchen auf Glucose-Cystin-Agar. Vergr. 460 fach.

Abb. 14. *M. viperus* auf Glucose- $\beta$ -Alanin-Agar. Vergr. 660 fach.

l-Cystin (0,2 mg/10 cm<sup>3</sup>) und  $\beta$ -Alanin (0,5 mg/10 cm<sup>3</sup>), wobei die N-Menge zum Teil den MÖLLERSchen Konzentrationen angepaßt ist. Die hohe C-Gabe im Verhältnis zur N-Quelle wurde deshalb gewählt, um eine gleichzeitige Ausnutzung der Aminosäure als C- und N-Quelle möglichst zu vermeiden. Die Bebrütung jeder Kulturserie wurde mindestens 15 Tage lang bei mehrmaliger Kontrolle durchgeführt, um eine Verschiebung von der vegetativen nach der fruktifikativen Phase, die oft erst sehr spät erfolgt, noch registrieren zu können und somit eine voreilige Beurteilung zu vermeiden.



Ausgesprochen schlechtes Wachstum erfolgte auf Glucose-Glutaminsäure-Agar, Fruchtkörperbildung kam hier überhaupt nicht zustande (Abb. 11). Auch in einer Vergleichsserie, bei der die Glutaminsäurehydrochlorid-Menge um die Hälfte verringert wurde, konnten keine besseren Erfolge erzielt werden. Glucose-Leucin-Agar war auch nur bedingt verwertungsfähig; in allen Kulturen war das Wachstum schwach und verzögert. Im Verlauf der Versuchsdauer besserte es sich allerdings bei 3 *Myxococcaceen*-Arten und führte schließlich sogar zur Fruchtkörperbildung. Glucose-Asparaginsäure-Agar (Abb. 12) und Glucose-Cystin-Agar konnten im großen und ganzen gleich gut verwertet werden, ein



Abb. 15.

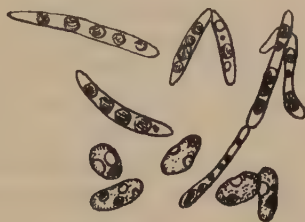


Abb. 16.

Abb. 15. Form H auf Glucose- $\beta$ -Alanin-Agar, Vergr. 500 fach.

Abb. 16. *M. brevipex* auf Glucose- $\beta$ -Alanin-Agar, Sporen und Stäbchen mit verschiedenen Inhaltskörnern. Vergr. 3300 fach.

gewisser Zusammenhang zwischen den beiden Entwicklungsphasen war unverkennbar: gesteigerte vegetative Entwicklung zog auch meist gute Fruchtkörperbildung nach sich. Gemeinsames Merkmal auf Glucose-Cystin-Agar ist dichtes vegetatives Schwarmwachstum, wobei die geraden bis gekrümmten, ja zum Teil spiraligen Stäbchen wirt auf der Agaroberfläche liegen oder in den Agar hineingebohrt sind (Abb. 13). Am besten verwertet wurde  $\beta$ -Alanin, was sich in Förderung der Wachstumsintensität und Teilungsfähigkeit der vegetativen Stäbchen und gesteigerter Sporulation mit und ohne Fruktifikation äußerte (Abb. 14, 15). Es ist daher anzunehmen, daß  $\beta$ -Alanin für die Myxobakterien Wuchsstoffcharakter besitzt. Diese Feststellungen zeigen deutlich, daß ein nicht zu übersehender Unterschied in der Ausnutzbarkeit der einzelnen Aminosäuren durch die 8 *Myxococcaceen*-Arten besteht, wobei artspezifische Merkmale unverkennbar ausgebildet sind.

Auffallend ist die gleichmäßig gute Verwertung aller geprüften Aminosäuren für *M. rubescens* bei gleichzeitiger Beibehaltung der Glucose-typischen Wuchsform in der vegetativen Phase und einem einheitlichen makroskopischen Erscheinungsbild. *M. rubescens* verfügt also



über breite Ausnutzungsfähigkeit der N-Quellen, die sich vom mineralischen Stickstoff über Aminosäuren, Peptone und Eiweiß erstreckt. *M. virescens* nimmt in der ganzen Reihe eine Sonderstellung ein; bei ihm vermochte nur Asparaginsäure eine gleichmäßig gute vegetative und fruktifikative Entwicklung hervorzurufen, während die übrigen Aminosäuren auch in mehreren Parallelversuchen das Wachstum völlig hemmten. Diese Erscheinung deutet auf ein enges Spezialistentum innerhalb einzelner Arten. *M. viperus* läßt in der Wachstumstendenz keine Beziehungen zu *M. virescens* erkennen, die Entwicklung verlief nur einseitig vegetativ; unter Einwirkung von Asparaginsäure und  $\beta$ -Alanin erfolgte im freien Schwarmbereich Übergang zur Stäbchenverkürzung und Kokkenbildung (Abb. 14). *M. cerebriformis* und in geringerem Maße *M. brevipes* zeichnen sich durch ihre alle anderen Stämme überragende Entwicklungshöhe aus, die bei *M. cerebriformis* in einer völlig normalen vegetativen und wenig modifizierten fruktifikativen Phase zum Ausdruck kommt, während bei *M. brevipes* auf allen Aminosäure-Substraten eine neue Entwicklungsphase (Stäbchen-Stauchung und -Abrundung) auffällt (Abb. 16). Ob die Ursache dieser gesteigerten Sporulationstendenz bei *M. brevipes* hier artspezifisch begründet ist, oder ob sie als Glucose-typische Erscheinungsform anzusehen ist, können nur weitere Versuche bei Ausschaltung von Glucose ergeben.

Andererseits tritt diese neue Erscheinungsform auch gerade in solchen Kulturen auf, die eine erhöhte vegetative und fruktifikative Entwicklung zeigen, so daß man annehmen könnte, daß der nährstoffbedingte gesteigerte Stoffwechsel der Schwarmorganismen die Sporulation gleichzeitig so rasch einleitet und zu Formveränderungen führt, daß nur noch in geringem Maße eine Zusammenlagerung zu Fruchtkörpern erfolgen kann.

Form *H* und *M. polycistus* wurden durch Asparaginsäure, Cystin und  $\beta$ -Alanin in beiden Entwicklungsstadien gefördert, während bei *M. albus* nur durch Cystin und  $\beta$ -Alanin eine wesentliche Vermehrung der Körpersubstanz eintrat.

Um das Zusammenspiel dieser Aminosäuren näher zu ergründen, werden sie zusammen bei gleichbleibender Einzelkonzentrationshöhe als Nährmedium geprüft. Gleichzeitig war noch festzustellen, ob die toxische Wirkung der Glutaminsäure im Gefolge der anderen Aminosäuren aufgehoben wird, oder ob sie ihre Eigenart behält. Es ergab sich:

Die Aminosäuren zusammen ohne Glutaminsäure ließen es in fast allen Kulturen nicht über ein schwaches bis gutes vegetatives Wachstum hinauskommen, nur bei Form *H* und *M. albus* traten wenige Fruchtkörper auf. Die Aminosäuremischung samt Glutaminsäure bot dagegen ein überraschendes, nicht erwartetes Ergebnis. Alle 8 *Myxococcaceen*-stämme verwerteten diesen Nährboden außerordentlich gut, woraus

hervorgeht, daß die toxische Wirkung der Glutaminsäure in Gemeinschaft der anderen Aminosäuren nicht nur restlos aufgehoben wird, sondern zusammen mit der an sich wenig wirksamen Aminosäuremischung starke Zuwachseffekte hervorruft. Eine ähnliche Erscheinung konnten NIELSEN und HARTELIUS (1939) an  $\beta$ -Alanin bei Hefe beobachten. Über die antagonistische Wirkung von Aminosäuren vgl. RIPPEL-BALDES (1944).

#### 4. Wirkung von Wuchsstoffen.

Die weiteren Untersuchungen galten der Aufklärung des Wuchsstoffbedürfnisses der *Myxococcaceen*. Dazu wurden die Wirkstoffe zusammen mit der obigen Aminosäuremischung oder auch allein dem Glucose-Agar zugesetzt. Die Auswahl der Wuchsstoffe konnte leider nicht nach einem bestimmten Prinzip getroffen werden, sondern sie richtete sich nach ihrer Erhältlichkeit, wobei allerdings die Hefewuchsstoffe soweit wie möglich Berücksichtigung fanden.

Durch Vitamin B<sub>2</sub> oder Lactoflavin wurde bei den *Myxococcaceen* weder mit noch ohne Aminosäuren erhöhtes Wachstum erzielt. Die an sich günstige Wirkung der Aminosäurekombination wurde durch den Lactoflavinzusatz in den meisten Fällen abgeschwächt, bei *M. virescens* führte er sogar zu völliger Entwicklungshemmung. Die bei *M. cerebri-formis*, Form H und *M. albus* etwas gesteigerte Wachstumsintensität in den aminosäurefreien Kulturen kann meines Erachtens nicht dem Lactoflavin zugeschrieben werden, da auf diese Stämme schon reine Glucose günstige Wirkung hatte. Die Unwirksamkeit des Vitamins B<sub>2</sub> kann vielleicht damit erklärt werden, daß ein enger Zusammenhang zwischen Lactoflavin und dem oxydativen Stoffwechsel bestehen soll, der aber, wie Versuche weiter vorn erwiesen haben, bei den *Myxococcaceen* stark vermindert ist.

Die Versuche mit einem Pantothenensäurepräparat ergaben ein wesentlich günstigeres Bild. Pantothen-saures Calcium in Kombination mit den Aminosäuren verursachte bei allen 8 *Myxococcaceen*-Stämmen deutliche Wachstumsbeschleunigung und gleichzeitige Förderung der Fruktifikation. Pantothen-säure allein war für *M. virescens* so schädlich, daß er überhaupt nicht anging, für die Mehrheit der übrigen Arten war der Entwicklungsrhythmus verzögert und sichtlich gehemmt, nur bei *M. albus* und *M. polycistus* war eine Förderung zu erkennen. Ob hier wirklich die Pantothen-säure Wuchsstoffcharakter besitzt, oder ob dem  $\beta$ -Alanin, das im Pantothen-säuremolekül enthalten ist, die biokatalytische Funktion zukommt, kann bei der augenblicklich noch bestehenden Undurchsichtigkeit des Wirkungsmechanismus dieser Stoffe nicht beantwortet werden.

Zwei Möglichkeiten konnten dafür in Frage kommen: einmal kann die Pantothenensäure durch Stoffe des Zellplasmas inaktiviert werden, wobei sich  $\beta$ -Alanin abspaltet und somit dieses den Wuchsstoff darstellt. Man könnte sich die Verhältnisse aber auch so vorstellen, daß die Pantothenensäure die eigentliche Wirkstofffunktion besitzt und die Myxobakterienzelle bei Darreichung von  $\beta$ -Alanin selbst in der Lage ist, die andere Komponente zu synthetisieren, die zu Pantothenensäure führt.

Die Wachstumswirkungen des Adermins (Vitamin B<sub>6</sub>) sind sehr auffallend und ungewohnt. Es löste bei den *Myxococcaceen* zwei extreme Reaktionen aus: Bei *M. virescens*, *M. brevipes* und *M. polycistus* führte es zu völliger Wachstumshemmung, bei *M. viperus*, *M. cerebriiformis*,



Abb. 17.

Abb. 17. Form H auf Glucose-Adermin-Agar mit meist endständigen Inhaltskörnern in den Sporen. Vergr. 2000 fach.



Abb. 18.

Abb. 18. *M. viperus* auf Glucose-Adermin-Agar mit Inhaltskörpern und Vakuolen. Vergr. 2000 fach.

Form H und *M. albus* schuf es die Voraussetzungen für gesteigertes Wachstum mit einer Kette von Folgeerscheinungen. Diese Wachstumsanregung löste hier den beschleunigten Ablauf eines modifizierten Entwicklungszyklus aus, der sich entweder in der Ausbildung atypischer, unausgeprägter Fruchtkörper mit Kokken und Übergangsformen als Inhalt äußerte oder sämtliche Schwarmstäbchen sekundär einheitlich in verdickte und verkürzte, runde bis unregelmäßig amöboid geformte Plasma-gebilde mit stark hervorstechenden granulierten Inhaltsstoffen überführte (Abb. 17, 18). Dieses ganze durch Adermin hervorgerufene Erscheinungsbild läßt zwar keinen bestimmten Wirkungsmechanismus erkennen, doch weist es auf hochkomplizierte Tätigkeiten der Bakterienzelle hin, deren Reaktionsweise von Art zu Art so ganz verschieden zur Auswirkung kommt. Dieses dadurch zustande gekommene Spezialistentum kann auch gleichzeitig als Beweis für die Artumgrenzung auf physiologischer Grundlage herangezogen werden.

Als Bestandteile des Vitamin H-Komplexes wurden Adenin und Nikotinsäureamid geprüft.

Der Zusatz von 0,1 mg und 0,05 mg Nikotinsäureamid zu reinem gewässertem Agar brachte keine verwertbaren Ergebnisse, denn der reine Agar kann, wie diesbezügliche Versuche ergaben, von Myxobakterien



nicht als C-Quelle abgebaut werden, und das in Spuren zugesetzte Nikotinsäureamid kann noch weniger als Material für den Zellaufbau und als Energielieferant in Frage kommen. Deshalb wurde zu Nikotinsäureamid Glucose als gut verwertbare C-Quelle in üblicher Höhe zugesetzt. Bei *M. cerebriiformis*, Form *H* und *M. albus* wurde dadurch die Wachstumsintensität gesteigert, was allerdings gleichzeitig mit einer Störung des Wachstumsverlaufs gekoppelt war. Die sonst geraden Schwarmstäbchen waren gekrümmt, stark spiralförmig und wirr durcheinander in den Agar hineingebohrt. Das Nikotinsäureamid hob in allen Kulturen die Glucosetypische Wuchsform auf.

Die Versuchsreihe mit Glucose-Adenin-Agar ist in ihrer Gesamtheit durch keine wachstumsfördernde Tendenz gekennzeichnet, lediglich *M. albus* hebt sich aus dem Rahmen der übrigen *Myxococcaceen* etwas heraus. Der bei ihm durch Adenin erreichte Entwicklungsgrad entspricht aber durchaus dem der reinen Glucose ohne Wirkstoffzusatz, so daß für alle anderen Stämme Adenin eher hemmend wirkte und bei *M. virescens* und *M. polycistus* das Wachstum sogar völlig unterdrückte.

Neben diesen Hefewuchsstoffen gelangten noch weitere Substanzen mit Wirkstoffcharakter wie p-Aminobenzoessäure und Heteroauxin (=  $\beta$ -Indolylessigsäure) zur Anwendung (Abb. 19). Sämtliche *Myxococcaceen* erhielten durch diese Wuchsstoffe keine Wachstumsanregung.

Nach den bisherigen Feststellungen kann über das Wuchsstoffbedürfnis unserer *Myxococcaceen* noch kein zusammenfassender Überblick gegeben werden. Wenn auch die bis jetzt für alle Arten gemeinsam erzielten positiven Erfolge, die nur in der stark wachstumsfördernden Wirkung von  $\beta$ -Alanin und pantothen-saurem Calcium bestehen, noch gering sind, so geben diese Versuche doch einen wichtigen Ausblick in biologischer und systematischer Hinsicht. Die verschiedenartige hier aufgezeigte Reaktionsweise so nahe verwandter Organismen bestätigt erneut, daß die stoffwechselphysiologischen Verhältnisse eines Verwandtschaftskreises nicht gleichsinnig orientiert sind, sondern von Art zu Art gesonderte spezielle Fähigkeiten entwickelt sein können, die in den zum Teil sehr einseitigen Lebensäußerungen zum Ausdruck kommen.



Abb. 19. *M. cerebriiformis* auf p-Aminobenzoessäure-Agar mit Inhaltskörnern. Vergr. 1200 fach.



## 6. Wachstumsbeeinflussung durch Fremdorganismen.

Die Myxobakterien stellen bekanntlich eine Organismengruppe dar, die sehr stark zur symbiontischen Lebensweise neigt, die in *Chondromyces crocatus* (KÜHLWEIN 1947) ihre höchste Entwicklung erfährt. Im Laufe der Züchtungsversuche der *Myxococcaceen* konnte zwar erneut bestätigt werden, daß ein Großteil der *Myxococcus*-Arten, die der äußeren Form nach die primitivste Ausgestaltung aufweisen, in Reinkultur gut und völlig normal gedeihen, und daß auch im Laufe zahlreicher hintereinandergeschalteter verschiedener Nährstoffpassagen das Fehlen der Reize und Einflüsse der natürlichen Umwelt sich nicht negativ geltend machte. Einige *Myxococcaceen* wie *M. viperus*, *M. polycistus* und *M. brevipes* gelang es wohl ohne Schwierigkeiten in Reinkultur zu züchten, doch war die Wachstumsintensität des vegetativen Schwarmes meistens verringert, die Fruktifikation blieb aus, oder es kam nicht selten zumindest zu Verlust der Farbstoffbildung und geringerer Formdifferenzierung der Fruchtkörper. Gerieten nun in solche Kulturen durch Öffnen der PETRISCHALEN Luftinfektionen von anderen Bakterien oder Hefen und bildeten hier Kolonien, so war in vielen Fällen eine günstige Beeinflussung von seiten des Fremdorganismus unverkennbar. *M. brevipes* bildete oft über Luftkokkeninfektionen oder am Rande zwischen Schwarm und Infektion zahlreiche intensiv gefärbte, große Fruchtkörperwülste, wenn sonst in der übrigen Kultur keine Fruchtkörperbildung auftrat oder der Schwarm noch nicht zur Fruktifikation übergegangen war. Noch viel mehr als bei *M. brevipes* war bei *M. polycistus* und *M. cerebriiformis* das Vorhandensein anderer Bakterien als Reiz für die Fruktifikation wirksam. *M. polycistus* z. B., der in Reinkultur auf mehreren Nährsubstraten nur sehr selten fruktifiziert, zeigte auf Hefeagar unter der Einwirkung verschiedener Infektionsherde ein äußerst mannigfaches Bild in Form und Farbe der Fruchtkörper. Im infektionsfreien Bereich wurden nur farblose Schleimhügel als Fruchtkörper gebildet, im Bereich kleiner zerstreuter Stäbchenkolonien traten vermehrte kupferrot gefärbte cystige Fruchtkörper auf; über einer schleimigen gelben Luftkokkeninfektion waren die Fruchtkörper leuchtend rot von unregelmäßiger übernormalgroßer Form, und in und am Rande einer weißen milchigen Kurzstäbchenkolonie erhielten die Fruchtkörper eine leuchtend rote, langgestreckte, wulstige Prägung, wobei die Schleimfarbe des *Myxococcus* die Infektionskolonie noch leicht rosa anfärbte. Diese starke Variationsbreite in der Fruchtkörpergestalt und -farbe und das vermehrte Auftreten im Zusammenleben mit anderen Bakterien deuten darauf hin, daß das wirksame Prinzip in Stoffwechselausscheidungsprodukten von seiten der Fremdorganismen zu suchen ist. BAUR (1906), der diesen Vorgang in geringerem Maße schon bei *Myxococcaceen* beobachtet hat, sah diese Anregung zur Fruchtkörper-

bildung nur im Anreiz zur Sporulation. Aus unseren eigenen, oben geschilderten Versuchsserien geht aber schon klar hervor, daß Sporulation und Fruktifikation nicht gekoppelt sind.

### 7. Bactericide und fungicide Wirkung der Myxococcaceen.

Über bactericide und fungicide Wirkungen durch Myxobakterien konnten in der Literatur keine Hinweise gefunden werden. Im Verlaufe der Untersuchungen konnte bei *M. rubescens*, *M. viperus*, *M. cerebriformis*, Form H, *M. brevipes* und *M. polycistus* die Bildung von Anti-

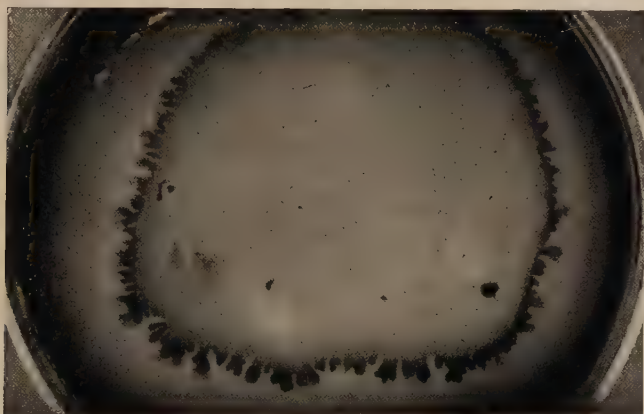


Abb. 20. *M. cerebriformis*, 3 Hemmungshöfe innerhalb des Infektionsbereichs. Nat. Größe.

biotica gegen Luftkokken, Kurzstäbchen und Sporenbildner, ferner gegen *Aspergillaceen* und *Penicillium*-Arten beobachtet werden. Die Wirkung auf Bakterien erwies sich teils bakteriostatisch, teils bactericid; die Wirksamkeit konnte aus der Breite der vegetativen Schwarmzone der Myxobakterien ersehen werden. An der Berührungslinie von Stäbchenschwarm und Infektionskolonie trat öfters intensive Fruchtkörperbildung verbunden mit erhöhter Farbstoffproduktion und teilweiser Formabweichung auf (Abb. 20, 21, 22). Die Potenz zur Bildung solcher antibakteriellen Stoffe wechselte stark mit der Zusammensetzung des Nährmediums. Aus dem besonders häufigen Auftreten der antibiotischen Fähigkeiten auf Hefenährböden kann angenommen werden, daß auch für die Myxobakterien wie für die Aktinomyceten (v. PLOTTH 1947) im Hefesubstrat eine spezifische Substanz enthalten ist, die die Aktivitätsgrenze des antibiotischen Agens steigert. In einigen Versuchen wurde versucht, die Wirksamkeit von *M. rubescens*-Antibioticum auf *Staphylococcus aureus* festzustellen. Doch konnte dabei noch kein Nährboden gefunden

werden, in dem für *M. rubescens* und *Staphylococcus aureus* gleichmäßig günstige Wachstumsbedingungen vorhanden sind.

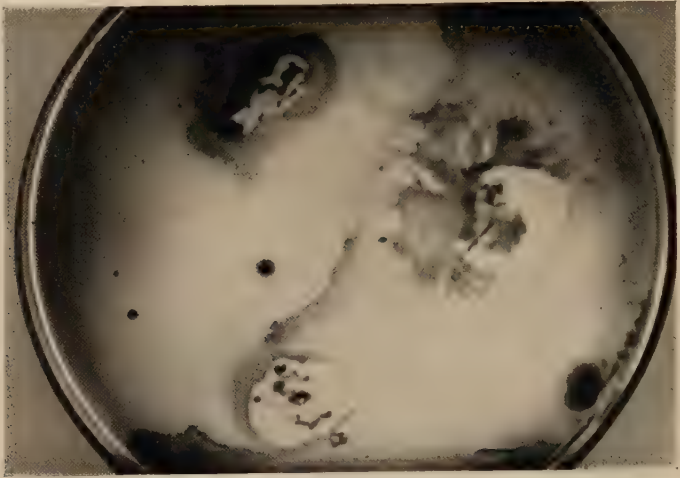


Abb. 21.

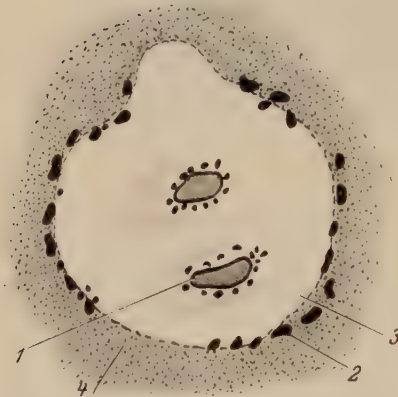


Abb. 22.

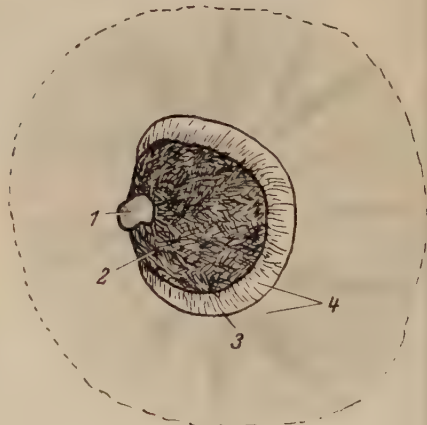


Abb. 23.

Abb. 21. *M. brevipipes*, deutliche Hemmungshöfe im Bereich dicker Infektionsherde. Natürl. Größe.

Abb. 22. Bactericide Wirkung gegen *M. brevipipes*: 1. Fruchtkörper um Impfagar heller gefärbt, 2. Frk. an der Grenze zwischen Infektionsbereich und Schwarmzone intensiver in der Farbe, 3. Schwarmbereich = Hemmungszone, 4. Infektionsbereich. Schwach vergrößert.

Abb. 23. Fungicide Wirkung durch Form H: 1. Impfagar, 2. Luftmycel des Pilzes stark gehemmt, 3. Substratmycel dehnt sich etwas weiter aus, 4. Zone des veg. Schwarmbereichs. Natürl. Größe.

Die antibiotische Wirkung der *Myxococcaceen* gegenüber Schimmelpilzen wie *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten trat in weit höherem Maße in Erscheinung. Diese ausgeprägte fungicide Reaktionsfähigkeit ist

eigentlich nicht verwunderlich, da Pilze ebenfalls sehr stark der koprophilen Lebensweise angepaßt sind und im Konkurrenzkampf mit den Myxobakterien stehen. Die hemmende Wirkung des antibiotischen Agens erstreckte sich vor allem auf das Luftmycel, das submerse Mycel konnte seine Entwicklung fortsetzen (Abb. 23).

Eine systematische Prüfung der fungiciden Wirkung wurde mit *Aspergillus fumigatus* als Testorganismus vorgenommen, der zufällig in mehreren Kulturen als Luftinfektion auftrat, pathogene Eigenschaften besitzt und starke Verdrängungsreaktionen zeigte. Als Nährmedium diente Hefeagar in einer Hefekonzentration von 1 : 10, der zuerst allein mit den Myxobakterienstämmen beimpft wurde. Nach zweitägiger Bebrütung wurden rings um die im Wachstum begriffenen Myxobakterienschwärme *Aspergillus fumigatus*-Sporen geimpft und die Kulturen bei 30° C weiterkultiviert. Dieser Vorsprung muß den Myxobakterien zur Ingangbringung des vegetativen Wachstums gewährt werden, denn nur eine reichliche Menge vegetativer Stäbchen ist in der Lage, dem sich viel rascher ausbreitenden *Aspergillus* zu trotzen. *M. rubescens* und *M. albus* zeigten sehr starke fungicide Wirkung: die Hemmungshöfe wiesen einen Durchmesser von 2—3 cm auf, in kleinen Pilzinfektionen innerhalb des Myxobakterienschwarmes war die Konidienbildung völlig, die Luftmycelbildung sehr stark gehemmt, es kamen wenige kropfförmig aufgeblasene Hyphen zur Ausbildung, an der Grenze zwischen Bakterien- und Pilzmycel wurde der Agar durch das Antibioticum intensiv gelb gefärbt. Bei *M. viperus*, *M. polycistus* und *M. brevipes* war die fungicide Wirkung geringer: der Durchmesser des Hemmungshofes betrug nur 1—2 cm, die sekundär erfolgten Neuinfektionen innerhalb des Myxobakterienschwarmes erfuhren nur noch eine kaum merkbare Hemmung, eine Beobachtung, die darauf schließen läßt, daß die Bildung des Antibioticums bei den aktiven Peripheriestäbchen am stärksten ist. Form *H* hingegen wies gegen *Aspergillus fumigatus* keine fungicide Wirkung auf.

### 8. „Hexenringbildung.“

Die Anordnung der Fruchtkörper in bestimmten Zonen, den sogenannten „Hexenringen“, ist im Laufe dieser Versuche bei den *Myxococcaceen* so auffallend und immer wiederkehrend in Erscheinung getreten, daß hier kurz darüber berichtet werden soll.

QUEHL, KOFLER und JAHN haben solche Vorgänge auch schon beobachtet, eine Vorstellung über ihre Entstehung hat aber nur JAHN zu geben versucht. Er sieht das Wesen der Hexenringbildung im Übergang der vegetativen Schwarmstäbchen zur Sporulation und sucht die Ursache der mit Sporulation verbundenen Fruchtkörperbildung in der Nährstofferschöpfung des konzentrisch sich ausbreitenden vegetativen Bakterien- oder Myxobakterienschwarmes.



Nach meinen Beobachtungen kann zu diesem Problem gesagt werden: Von äußeren Bedingungen und der Ursache der Sporulation kann die Hexenringbildung niemals in primärer Folge abhängig sein, denn die Sporulation kann völlig unabhängig von der Fruchtkörperbildung erfolgen. Sie spielt für die Entstehung dieser Ringe höchstens eine sekundäre Rolle. Ein weiterer Beweis gegen die Meinung, daß unter-

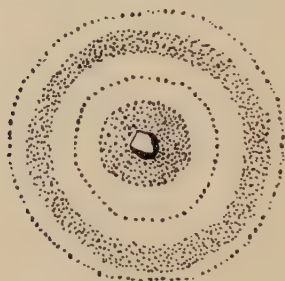


Abb. 24.



Abb. 25.

Abb. 24. *M. rubescens*, Schema der artspezifischen Fruchtkörperanordnung.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe.

Abb. 25. *M. albus*, desgl.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe.



Abb. 26.

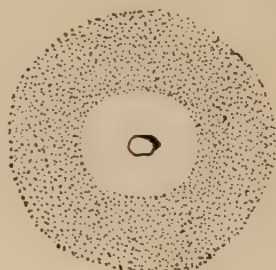


Abb. 27.

Abb. 26. Form H, Schema der artspezifischen Fruchtkörperanordnung.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe.

Abb. 27. *M. viperus*, desgl.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe.

schiedliche Diffusionsbedingungen für die ringförmige Anordnung der *Myxococcaceen*fruchtkörper in Frage kommen, ist die Tatsache, daß die Hexenringe der *Aktinomyceten* wie *Myxobakterien* sowohl auf dünnen wie dicken Nährgarschichten mit verschiedenem Diffusionsgefälle unterschiedslos gebildet werden. Auch bringen unsere *Myxococcaceen*stämme ihre Fruchtkörper rings keineswegs nur auf schlechten Nährsubstraten hervor. Der nährstoffreiche Pepton- oder Hefeagar rief in den meisten Fällen trotz teilweisen Ausbleibens der normalen Fruchtkörperbildung

eine zonenweise Schichtung im Schleim oder farbliche Kontrastzonen hervor. Auch weitere äußere Einflüsse wie der Wechsel von Tag und Nacht, Temperatur und Feuchtigkeitsunterschiede können nicht als entscheidende Faktoren für die Hexenringbildung angesehen werden. Meines Erachtens ist die Ringbildung entsprechend der Auffassung LIESKES in erster Linie einer inneren, erblich bedingten Ursache zuzuschreiben, denn alle 8 *Myxococcaceen*stämme zeigten auf den verschiedensten Nährmedien mehr oder weniger deutlich Ringbildungen; bei einigen Arten wie *M. rubescens*, Form *H*, *M. viperus* und in geringerem Maße bei *M. virescens* und *M. albus* blieb dabei die Anordnung der Fruchtkörper in Ringen und deren Aufeinanderfolge so artspezifisch erhalten (Abb. 24, 25, 26, 27), daß kein Zweifel mehr bestehen kann, daß der Bildungsvorgang von einem inneren, erblichen Faktor ausgelöst wird.

### 9. Untersuchung der Variabilität.

Im Laufe dieser Kulturversuche in verschiedenen Nährmedien wurden so viele substrattypische vegetative und fruktifikative Wuchsformen der *Myxococcaceen*stämme beobachtet, daß es von Interesse war, festzustellen, ob diese durch stoffwechselphysiologische Einflüsse bewirkten Veränderungen nur jeweils an das betreffende Nährmedium gebunden waren, oder ob darüber hinaus die variierte Form auch beibehalten wird. Zur Klärung dieser Frage wurden *M. rubescens* und *M. virescens* aus frisch beimpften Mäusemistagarplatten hintereinander nach jeweils 8 tägiger Kulturdauer auf verschiedene Nährböden geimpft, und zwar auf Hefe-, Lößerde-, Glucose-, Trypsin- und Pepton-Agar in verschiedenen abwechselnder Reihenfolge, wobei das Endglied dieser Nährbodenreihe wieder Mäusemist-Agar war. Von den 5 für *M. rubescens* ausprobierten Nähragar-Manipulationen konnten 3 Passagen bis zur Rückimpfung auf Mäusemist-Agar durchgeführt werden, während bei *M. virescens* nur 2 Passagen beendet werden konnten. Beide *Myxococcaceen*stämme traten nach diesen wechselnden Nährbodenpassagen auf Mäusemist-Agar wieder in der ursprünglichen normalen Wuchsform auf, wobei gleichzeitig das vegetative und fruktifikative Wachstum gefördert war. Die für die einzelnen Nährsubstrate typischen variierten Wuchsformen beschränkten sich also jeweils nur auf diese und wurden bei Übertragung auf ein anderes Nährmedium nicht beibehalten. Nur die Hefewuchsform klang in der darauffolgenden Passage etwas nach. Die Variabilität in der Wuchsform kann daher nur als eine substratgebundene Modifikation bezeichnet werden. Gleichzeitig läßt dieser Versuch erkennen, daß *M. rubescens* und *M. virescens* zwei konstante Arten sind, die zwar eine substratbedingte Wandlungsfähigkeit besitzen, aber bei Rückkehr in die Ausgangsbedingungen sofort wieder die normale Erscheinungsform annehmen.

## E. Beschreibung der Arten nach morphologischen und physiologischen Gesichtspunkten.

Wie aus den zahlreichen obigen Untersuchungen hervorgeht, unterscheiden sich die 8 untersuchten *Myxococcaceen*stämme sowohl nach kulturellen, wie auch nach morphologischen und physiologischen Eigenschaften so deutlich voneinander, daß sie niemals als Subspezies einer oder zweier Arten angesehen werden können. Einen Versuch in dieser Richtung hat QUEHL (1906) unternommen; er hat alle ihm bekannten *Myxococcaceen* mit kugelförmigen Fruchtkörpern auf Grund von Sporengröße und Farbmerkmalen in eine *rubescens*- und eine *virescens*-Gruppe aufgeteilt, um einen „Wirrwarr von Arten“ zu vermeiden. Bei den von QUEHL untersuchten Stämmen scheint es sich auch wirklich nur um verschieden modifizierte Varietäten oder Standortrassen der Arten *M. rubescens* und *M. virescens* gehandelt zu haben, denn Formen mit so geringen von ihm ins Feld geführten Unterscheidungsmerkmalen können nicht als wirklich konstante Arten definiert werden. Später hat auch JAHN in seiner Systematik noch teilweise an der alten Anschauung über die *Myxococcus*-Arten festgehalten, doch fügte er auch schon eine Reihe inzwischen gefundener morphologisch gut definierter Arten neu hinzu. Nachstehend soll nun eine kurze Charakteristik der hier behandelten *Myxococcaceen*stämme gegeben und gleichzeitig versucht werden, sie in die JAHNsche Systematik einzubauen. Als wesentlicher Gesichtspunkt für die systematische Gliederung kamen nur solche morphologische und physiologische Merkmale in Frage, die sich während der ganzen Kulturversuche als artcharakteristisch und konstant erwiesen haben. Es muß darauf hingewiesen werden, daß Sporen- und Stäbchengröße nicht als ausschlaggebende Merkmale angesehen werden können, denn im Laufe dieser Versuche hat sich herausgestellt, daß unter dem Einfluß verschiedener Nährstoffgaben vor allem die Sporengröße so großen Schwankungen unterlag, daß sie nur bedingt als konstant bezeichnet werden kann. Zu den alten, schon beschriebenen und genau definierten Arten sollen nur kurze Ergänzungen hinzugefügt, die neuen Arten jedoch ausführlicher behandelt werden.

### 1. *M. rubescens* (Thaxter).

Die Farbe der Fruchtkörper schwankte zwischen leuchtend rot bis schwach rosa, völlige Farblosigkeit wurde nie beobachtet. Waren keine ausgeprägten Fruchtkörper vorhanden, so färbte sich meist in nährstoffreichen Medien der ganze Schwarmbereich rosa bis rot mit einer gewissen Fluoreszenz. Die Geschwindigkeit des vegetativen Wachstums war auf allen Substraten verhältnismäßig gering gegenüber dem der anderen Stämme. Fruktifikation trat meist nur auf nährstoffreichen Substraten ein. Die ringförmige Anordnung der Fruchtkörper ist artspezifisch.

### 2. *M. albus* n. sp.

Die Art kann nach JAHN und KÜHLWEIN wohl nicht mit *M. rubescens* var. *albus* in Zusammenhang gebracht werden. Die Sporen- und Stäbchengröße erwies sich in



allen Kulturen als etwas schwankend. Die Fruchtkörperfarbe blieb einheitlich milchig weiß bis beige. Die Fruchtkörper zeichneten sich durch eine ausgesprochene Kurzlebigkeit und große Zerfließlichkeit aus, bei etwa 30°C werden nur flache, runde, wie Öltropfen erscheinende Schleimhügel gebildet, bei niedrigerer Temperatur waren sie etwas schärfer geprägt. *M. albus* war unter den 8 Stämmen die raschwüchsigste Form; schon nach 1—2tägiger Kultur erschienen oft zahlreiche Fruchtkörper. Es scheint eine Art zu sein, die in stoffwechselphysiologischer Hinsicht keine speziellen Bedürfnisse aufweist; die Kulturen zeigten auf Nährsubstraten, in denen die anderen Stämme oft sichtlich gehemmt waren, immer noch gutes vegetatives und fruktifikatives Wachstum.

### 3. *M. virescens* (Thaxter)

verliert anscheinend in künstlicher Kultur gern die Fähigkeit zur Bildung von Fruchtkörpern; traten welche auf, so waren sie meist blaß, klein und in der Form wenig differenziert. Der grüngelbe, den normalen Fruchtkörpern eigene Farbstoff trat nur in Kulturen mit hohem Nährstoffgehalt, und zwar dann innerhalb des ganzen Schwarmbereiches sehr intensiv auf. Hervorzuheben sind die hohen ernährungsphysiologischen Ansprüche in bezug auf die C- wie N-Quelle. Glucose wurde nicht verwertet, ebenso kein anorganischer Stickstoff und nur einzelne Aminosäuren und Wuchsstoffe (siehe S. 372, 373, 374, 375), wobei die Wachstumsintensität sehr gering blieb. *M. virescens* benötigt anscheinend hochmolekulares Eiweiß, denn nur Pepton- und Hefesubstrat ermöglichte gute vegetative Schwarmausbreitung.

### 4. *M. viperus* n. sp.

Diese Form wurde anfangs als Abart von *M. virescens* betrachtet, weil sie äußerlich Ähnlichkeiten mit dieser Art aufweist und dieselbe Sporengröße besitzt. Im Verlauf der Versuche stellte sich jedoch ein derartig unterschiedliches Verhalten heraus, daß die Beziehungen zu *M. virescens* nicht mehr aufrechterhalten werden konnten. Es ist eine Art, die sehr stark zur symbiontischen Lebensweise neigt, bei Züchtung in Reinkultur einen Teil ihrer Wachstumsintensität einbüßt und vor allem die charakteristische gekrümmte, geschlängelte Prägung und leuchtende Farbe der Fruchtkörper verliert. Erst im Bereich einer Bakterieninfektion erhalten die Fruchtkörper wieder ihre normale Form und die intensiv gelbe bis kupferrote Farbe. In der äußeren zähen Schleimschicht der Fruchtkörper bleibt immer ein mehr oder weniger gut ausgebildeter Stäbchenmantel um die Sporenmasse erhalten. Diese Erscheinung und das verhältnismäßig günstige Ansprechen auf Wuchsstoffe läßt vermuten, daß gewisse stoffwechselphysiologische Beziehungen zu den Begleitorganismen bestehen. Ein besonderes Merkmal ist die fast in allen Kulturen auftretende Neigung zur einheitlichen Verkürzung und Verdickung der Schwarmstäbchen ohne Fruchtkörperbildung. Als Charakteristikum ist noch hervorzuheben, daß auf Hefeagarplatten die zuerst grüngelbe Farbe des Schwarmbereiches bei 12—20stündiger Aufstellung am Tageslicht in schwachrot bis leuchtend rot übergeht. Die Hexenringbildung ist artspezifisch. Ich möchte diese Art in Anpassung an ihre geschlängelte Wuchsform als *M. viperus* bezeichnen.

### 5. *M. cerebriformis* n. sp.

stellt eine Art dar, die wohl der morphologischen Beschreibung von KOFLEERS *M. cerebriformis* entspricht, jedoch von ihr abweichende Sporengröße besitzt. In dieser Hinsicht stimmt sie völlig mit dem JAHNSchen *Archangium gephyra* überein.



Die Sporen der Fruchtkörper wiesen stets eine runde bis längliche, bohnenförmig gekrümmte oder gestreckte Kurzstäbchenform auf, die zwischen  $2,6$  und  $6,5 \mu$  Länge und  $1,3$ — $2,8 \mu$  Breite schwankte. In allen Kulturen blieben die Sporen der Fruchtkörper so dicht verbacken, daß sie beim Zerdrücken in einer Anzahl kleiner Brocken zusammenhielten. *M. cerebriiformis* zeigte sowohl auf nährstoffarmem wie nährstoffreichem Substrat ein ziemlich gleichmäßig gutes bis sehr gutes vegetatives und fruktifikatives Wachstum mit teilweiser normaler Fruchtkörperprägung. Als besondere Leistung muß die natürliche Fruchtkörperbildung in dem hochwertigen Hefemedium betrachtet werden, das bei allen anderen Formen völlige Hemmung oder zumindest starke Verzögerung der Fruktifikation bewirkte. Es ist anzunehmen, daß dieser *Myxococcus* mit *Archangium gephyra* Jahn identisch ist, sein Verhalten im vegetativen wie fruktifikativen Stadium entspricht jedoch ganz und gar dem Typus der *Myxococcaceen*, weshalb ich vorschlagen möchte, die Bezeichnung *Archangium gephyra* aufzugeben, und diese Art als *M. cerebriiformis*, dessen Name viel besser den äußeren Habitus zum Ausdruck bringt, in die Gattung *Chondrococcus* der *Myxococcaceen* einzureihen.

### 6. *M. brevipes* n. sp.

Die Fruchtkörpergestalt dieser Form könnte mit den Diagnosen von *Chondromyces gracilis* Kofler, *Podangium gracilipes* JAHN und *M. cirrhosus* THAXTER in Einklang gebracht werden. Jedoch fehlen in den ersten beiden Beschreibungen die Angaben des Cysteninhalts, der hier  $1,3$ — $1,8 \mu$  große, unregelmäßig geformte Kokken darstellt. Die abgesetzte Cyste auf einem mehr oder weniger erhöhten, farblosen bis blassen Schleimfuß muß wohl als eine etwas abweichende *Myxococcus*-Form angesehen werden; unter den zum Teil extremen Versuchsbedingungen unterblieb aber meist die Fußbildung, und die Cyste trat als unregelmäßig gestalteter *Myxococcus*-Fruchtkörper auf. Das Erscheinungsbild dieser Form war unter den verschiedensten Nährstoffverhältnissen ziemlich einheitlich, die Ausbreitung des vegetativen Schwarmes ließ stets eine etwas gehemmte Tendenz erkennen, die wohl damit begründet werden kann, daß die Schwarmstäbchen im ganzen Bereich meist von Anfang an eine große Neigung zur Sporulation aufweisen und damit ihre Bewegungsfähigkeit aufgeben. Traten Fruchtkörper oder fruchtkörperähnliche Bildungen auf, so waren sie immer blaßrot bis leuchtend rot gefärbt. Die Schleimhülle der Fruchtkörper ist von ziemlich zäher Konsistenz, doch der Sporenhalt ist leicht zerfließlich. Wenn auch das Erscheinungsbild dieser Art etwas extreme Züge aufweist, so rechtfertigt die Sporenbildung in Kokkenform als Hauptmerkmal ohne weiteres die Einordnung in die Gattung *Myxococcus*. Als *M. brevipes* = Kurzfuß wird gleichzeitig zum Ausdruck gebracht, daß diese Form zu den in Cystophor und Cyste differenzierten Myxobakterien der Gattung *Chondromyces* überleitet.

### 7. Form H

war in der Rohkultur dem *Myxococcus brevipes* recht ähnlich, der hier vorhandene zusammenhängende Schleimfuß kam aber in sämtlichen Versuchsserien in Reinkultur nie mehr zur Ausbildung. Die Fruchtkörper traten meist als flache, glasklare, blaßgelbe Schleimhügel auf, selten zeigten sie einen etwas zerklüfteten Wuchs. Form H verfügt in allen Kulturen sowohl im vegetativen wie fruktifikativen Stadium über große Wachstumsgeschwindigkeit; ihr Nährstoffbedürfnis ließ keine Besonderheit erkennen, der größte Teil der dargebotenen Nährstoffe ermöglichte gutes bis sehr gutes vegetatives und fruktifikatives Wachstum. Die Art der Hexenringbildung erfolgte in charakteristischer Weise; Produktion bactericider und fungicider Stoffe wurde nicht beobachtet.

8. *M. polycistus* (Kofler)

stellt einen Stamm mit äußerst variabler Fruchtkörperform und -farbe dar, ohne daß deren gestaltendes Prinzip erkannt werden konnte. Ob es berechtigt ist, dafür wirklich eine eigene Art aufzustellen, ist nach den beobachteten ziemlich indifferenten Erscheinungsformen nicht recht ersichtlich. Ich neige eher dazu, diese Form als eine Varietät der Jahnsehen *Chondrococcus coralloides*-Gruppe zu betrachten, und zwar könnte die Beschreibung des dazu gehörigen *M. clavatus* oder *M. polycistus* Kofler bedingt zutreffen ohne Berücksichtigung der Sporengröße. Der kropfartig keulige Wuchs und die teilweise einheitliche rosa Farbe der Fruchtkörper in der Ausgangskultur kamen in Reinkultur auf künstlichem Substrat nie wieder so deutlich zum Ausdruck. Überhaupt scheint die Fruchtkörperbildung von *M. polycistus* an spezifische Nährstoffe gebunden zu sein und bei 20—25° C ihr Optimum zu besitzen. Die Schleimhülle der Fruchtkörper war sehr zäh; sie selbst erschienen teils als flache, unregelmäßige, blaßgelbe bis leuchtend orangegefärbte Schleimhügel, teils in Gestalt cystiger mit Höcker und Auswüchsen versehener Schleimmassen mit starken Farbkontrasten. Diese geflammte farbliche Prägung (Sockel weißlich, Auswüchse orange, Cystenspitzen rot) verstärkte sich vor allem beim Älterwerden der Fruchtkörper. Die Fruchtkörperbildung wurde durch Fremdorganismen gefördert; andererseits war diese Form auch befähigt, bactericid und fungicid wirksame Stoffe auszusenden. Gewisse Aminosäuren und Wuchsstoffe übten eine wachstumssteigernde Wirkung aus. Eine endgültige systematische Klassifikation des Stammes kann erst nach einer stoffwechselphysiologischen Durchprüfung der anderen zu der *Chondrococcus coralloides*-Gruppe gehörenden Spezies getroffen werden.

*Chondromyces* sp.

Bei dieser neu gefundenen Art setzt sich der Fruchtkörper aus einem nach oben verbreiterten Fuß und einer darauf ruhenden Cyste zusammen (ganze Höhe etwa 390  $\mu$ ). Der blasse und glasige Cystophor weist im ganzen eine Höhe von etwa 260  $\mu$  auf, bei einer unteren Breite von etwa 52  $\mu$  und einem oberen Durchmesser von 85  $\mu$ . Die Oberfläche der Cyste ist rund gewölbt oder in die Breite gezogen, teils nierenförmig (150—215  $\mu$ ) und am Rande etwas gelappt erscheinend, von gelber, milchiger Farbe. Der Stiel besteht aus einer äußerst zähen Schleimmasse, in die festverbackene Stäbchen eingelagert sind. Die Schleimsubstanz und der Inhalt des Hutes ist leicht zerfließlich und enthält ovale bis längliche oder eiförmige Kokken und Kurzstäbchen von 1,9—2,8  $\mu$  Länge und 1,3  $\mu$  Breite. Nach 1—2tägigem Stehen im Labor vollzogen sich einige Veränderungen: am Cystophor bildeten sich ein bis zwei Verzweigungen, die Farbe des Stieles nahm eine mehr rötliche Tönung an und neben dem Fuß alter Fruchtkörper kamen 2 neue weißlichgelbe runde Cysten hervor, aus denen sich neue kleinere Fruchtkörper differenzierten.

Dieser Organismus wurde einmal in saurer Erde des Botanischen Gartens in Karlsruhe auf sterilisiertem Hasenmist gefunden. Weder auf Rattenmist-, Wildkaninchenmist- noch auf Lößerde-Agar ist es gelungen, ihn in Kultur zu bringen. Diese Tatsache und das gehäufte Auftreten encystischer Amöben am Fuß des Fruchtkörpers lassen vermuten, daß es sich hier um eine symbiontische Art handelt.

## F. Zusammenfassung.

Die Ernährungsphysiologie der *Myxococcaceen* wurde auf breiter Basis untersucht, wobei folgende wesentliche Ergebnisse gefunden wurden:

Alle *Myxococcaceen*stämme mit Ausnahme von *M. virescens* können Glucose verwenden.

1% ige Pepton-Gabe löste in allen Fällen in der vegetativen Phase starke Wachstumssteigerung aus, wobei der Schwarmbereich ein völlig verändertes Aussehen erhielt und zur systematischen Diagnose herangezogen werden kann.

Aus eingehenden Beobachtungen geht hervor, daß der Anreiz zur Verkürzung der Stäbchen und die Sporulation unabhängig von der Fruchtkörperbildung erfolgten.

Die Wuchsformen auf Hefenährböden ließen folgende einheitlichen Merkmale erkennen: Gesteigertes vegetatives Wachstum, erhöhte Schleim- und Farbstoffbildung, Verzögerung der Kokkenbildung und damit meist verbunden modifizierte Fruktifikation. Bemerkenswert ist dabei die Vergrößerung der Stäbchen und Kokken, die sich zum Teil in ziemlich unregelmäßig geformten amöboiden Gebilden äußerte.

Die Überprüfung einzelner Aminosäuren zeigte folgenden Unterschied in ihrer Ausnutzbarkeit: Auf Glucose-Glutaminsäure-Agar erfolgte ausgesprochen schlechtes Wachstum; Glucose-Leucin-Agar war nur bedingt verwertungsfähig; Glucose-Asparagin- und Glucose-Cystin-Agar konnten im großen und ganzen gleich gut verwertet werden. Die besten Wachstumserfolge brachte Glucose- $\beta$ -Alanin-Agar, was in einer deutlichen Förderung der Wachstumsintensität und Teilungsfähigkeit der vegetativen Stäbchen und gesteigerter Fruktifikation zum Ausdruck kam.

Aus der Verwertbarkeit der einzelnen Aminosäuren läßt sich ein ziemlich ausgeprägtes Spezialistentum innerhalb der Gattung *Myxococcus* herleiten.

Die toxische Wirkung der Glutaminsäure für sich allein wurde in Gemeinschaft der anderen Aminosäuren nicht nur aufgehoben, sondern die Mischung ergab in allen Kulturen starke Zuwachseffekte.

Über das Wuchsstoffbedürfnis kann kein zusammenfassender Überblick gegeben werden. Teils wirkten Aminosäuren in Verbindung mit Wuchsstoffen als Aktivatoren. Bei allen Arten hatten  $\beta$ -Alanin und pantothen-saures Calcium stark wachstumsfördernde Wirkung. Lactoflavin und Adermin ließen keine Wachstumseffekte erkennen, Adermin brachte von Art zu Art sehr extreme Reaktionsweisen zum Ausdruck. Nikotinsäureamid wirkte in Verbindung mit Glucose teilweise wachstumsfördernd. Adenin, p-Aminobenzoesäure und  $\beta$ -Indolyl-essigsäure gaben in der angewandten Konzentration keine Wachstumsanregung.



Bei 6 *Myxococcaceen*-Arten konnte die Bildung von Antibiotica gegen Bakterien und Schimmelpilze festgestellt werden. Eine systematische Prüfung der fungiciden Wirkung wurde mit *Aspergillus fumigatus* als Testorganismus vorgenommen.

Die Anordnung der Fruchtkörper in Hexenringen und deren Aufeinanderfolge wurde als artspezifisch erkannt.

Bei *M. rubescens* und *M. virescens* wurde die Variabilität in der Wachstumsform auf verschiedenen Nährböden geprüft und als reine substratgebundene Modifikation festgestellt.

Zum Schlusse wird eine Beschreibung und Artumgrenzung der Versuchsorganismen nach kulturellen, morphologischen und physiologischen Unterscheidungsmerkmalen durchgeführt und versucht, sie in die JAHN'sche Systematik einzubauen. Dabei wurden 5 neue *Myxococcus*-Spezies und 1 neue *Chondromyces*-Art beschrieben.

—

Die Anregung zu vorliegender Arbeit verdanke ich Herrn Dr. H. KÜHLWEIN, Dozent am Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe. Für seine stets wohlwollende Förderung möchte ich ihm an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen.

Ferner möchte ich Herrn Dozent Dr. F. MOEWUS, Heidelberg, für die Überlassung der Wuchsstoffe sowie einige Literaturhinweise besonders danken.

### Literatur.

- BADIAN, J.: Acta Soc. Bot. Polon. **7**, 1 (1930); **10**, 3 (1933). — Arch. Mikrobiol. **4**, 3 (1933). — BAUR, E.: Arch. Protistenkunde **5** (1904). — JAHN, E.: Myxobacterales. Kryptogamenflora der Mark Brandenburg, V. Pilze, I, Lief. 2, 1901. — Die Polyangiden. Beiträge zur Botanischen Protistologie. Leipzig: Bornträger 1924. — Kulturmethoden und Stoffwechseluntersuchungen bei Myxobakterien (Polyangiden). Hdb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. XII, T. 2, H. 6 (1936). — JANKE, A.: Zbl. Bakter. II. Abt. **100** (1939). — KOFLER, L.: Die Myxobakterien der Umgebung von Wien. Sitzber. K. Ak. d. Wissensch. Math.-naturw. Kl. Wien, **122**, Abt. I (1913). — KRZEMIENIEWSKI, H. u. S.: Acta Soc. Bot. Polon. **4**, 1 (1926); Anhang. **5**, 1 (1927); (1928); **5**, 6 (1928); **7**, 2 (1930). — Bull. Acad. Polon. Sci. Lettres Classe Sci. Math. Nat., Ser. B, Sci. Nat. (1937). — KÜHLWEIN, H.: Arch. Mikrobiol. **14**, 678 (1950). — KÜHLWEIN, H., u. G. FINCK: Naturwissenschaften, **2**, 43 (1950). — LICHTENSTEIN, N., u. N. BROSSOWICZ: J. of biol. Chem. **171**, 1947, ref. Ber. über d. wissensch. Biol. **64**, 5/6 (1948). — LIESKE, R.: Morphologie und Biologie der Strahlenpilze (Aktinomyceten). Leipzig: Bornträger 1921. — Kurzes Lehrbuch der allgemeinen Bakterienkunde. Berlin: Bornträger 1926. — MILOVIDOV, P. F.: Arch. Mikrobiol. **6**, 475 (1935). — MÖLLER, E. F.: Angew. Chem. **53**, 204 (1940). — MUNK, W.: Zbl. Bakter. II. Abt. **32** (1912). — NIELSEN, N., u. V. HARTELIIUS: Biochem. Z. **301**, 125 (1939). — OEHLER, R.: Arch. Protistenkunde **49** (1924). — v. PLOTTO, O.: Arch. Mikrobiol. **14**, 142 (1948). — QUEHL, A.: Zbl. Bakter. II. Abt. **16** (1906). —



RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Berlin und Göttingen: Springer 1947. — RIPPEL-BALDES, A., u. W. KÖHLER: Arch. Mikrobiol. **13**, 389 (1944). — RUDOLF, W.: Die Vitamine der Hefe. Wissensch. Verlagsgesellschaft Stuttgart 1941. — SSOLUZEWA, L. J.: Mikrobiol. 8, 959 (russ.), ref. Chem. Zbl. II, 1596 (1940). — STANIER, R. Y.: J. of Bact. **44**, 4 (1942). — STAPP, C.: Zbl. Bakter. II. Abt. **106**, 338 (1944). — THAXTER, R.: Bot. Gazette **17** (1892); **23** (1897); **37** (1904). — VAHLE, C.: Zbl. Bakter. II. Abt. **25** (1909).

(Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Stuttgart,  
mykologisch-bakteriologisches Laboratorium.)

## Verbreitung und Physiologie mikroskopischer Bodenpilze.

Fine mykologische Studie  
als Beitrag zur Mikroflora der Umgebung Stuttgarts<sup>1</sup>.

Von

ROSE M. KREHL-NIEFFER.

(Eingegangen am 15. Dezember 1949.)

Die Schimmelpilzflora des Bodens wurde in den letzten Jahrzehnten wiederholt unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht (JANKE, NIETHAMMER, STARC, SZILVINYI). Auch rein systematische Zusammenstellungen der isolierten Arten von Schimmelpilzen sind für verschiedene Gebiete schon gemacht worden, für Württemberg fehlten jedoch solche bisher noch vollständig.

Bis jetzt besteht noch keine restlose Klarheit darüber, ob die Schimmelpilzflora des Bodens in ihrer Zusammensetzung eine Abhängigkeit von den Umweltfaktoren zeigt. Der bisher am häufigsten in die Untersuchung einbezogene Umweltfaktor ist wohl der Einfluß der höheren Pflanzenwelt. Wie alle Lebewesen, sind auch die Schimmelpilze von ihren Umweltbedingungen weitgehend abhängig. Nur sind diese nicht immer leicht genau zu definieren und zu erfassen. Manche Literaturangaben, vor allem die ausländischen, waren nicht, oder nur in Form von Referaten und Zitaten zugänglich. Aber auch der vorhandene kleine Ausschnitt zeigte schon deutlich, daß jede Gegend ihre eigene Schimmelpilzflora im Boden besitzt; die einzelnen Zusammenstellungen unterscheiden sich recht deutlich voneinander.

Im folgenden soll eine Zusammenstellung der Arten von Schimmelpilzen gegeben werden, die aus einigen württembergischen Böden isoliert werden konnten. Außerdem soll den Fragen der Abhängigkeit der Pilze von ihrer Umwelt und ihren physiologischen Leistungen etwas nachgegangen werden. Es wurden Mergel- und Sandböden der Stuttgarter Umgebung, also des Keupers, auf ihre Pilzflora untersucht. Zum Vergleich mit diesen, besonders im Sandstein ausgeprägt sauren Böden, wurden Juraböden der Schwäbischen Alb aus dem Weißjura und daneben noch alpine Bodenproben aus der Oberstdorfer Umgebung untersucht.

<sup>1</sup> Die ausführliche Fassung der Versuchsergebnisse (Dissertation) samt Tabellen kann von Spezialinteressenten jederzeit im Botanischen Institut der Technischen Hochschule Stuttgart eingesehen werden.

Diese Mitteilung wurde bewußt auf die Schimmelpilze beschränkt, Bakterien, Actinomyceten und Hefen wurden also nicht mit einbezogen.

### A. Methodik.

Die Bodenproben wurden aus 5—10 cm Tiefe direkt mit einem sterilen Reagensglas entnommen, das mit Wattestopfen versehen wurde, um die Bodenatmung nicht zu behindern. Der Rand des Glases wurde an Ort und Stelle mit einem Streichholz abgeflammt.

Zur Gewinnung der Rohkulturen wurden anfänglich zwei Wege beschritten: Einerseits die Aufschwemmung einer geringen Bodenmenge in sterilem Wasser, andererseits das direkte Auslegen von kleinen Erdbröckchen mit Hilfe von sterilen Nadeln.

Als Nährböden wurden verwandt:

1. Kartoffelscheiben und -keile oder Möhren; 2. angefeuchtete Brotbrösel; 3. Magermilch; 4. Malzpeptonagar nach ZYCHA; 5. Normalnährboden nach SOPP; 6. feinverteilte Erde mit Brunnenwasser; 7. CZAPEK-DOX-Agar; 8. physiologisch saure Nährlösung nach STAPP mit verschiedenen Kohlenstoffquellen: a) Cellulosestreifen aus Filtrierpapier, b) 5% Pectin in Form von Opekta-Gelee, c) 1,5 u. 10% kristallisierte Gerbsäure, d) 1 u. 5% Harnstoff; 9. abgeänderte STAPP-Lösung mit Harnstoff als Stickstoffquelle; 10. Fleischagar abgeändert nach BERNHAUER.

Für die Roh- und Anreicherungskulturen wurden Kartoffeln als Nährboden benutzt. Für die mikroskopische Untersuchung der Arten zu ihrer systematischen Einreihung wurden sie auf CZAPEK-DOX-Agar, dem Standardnährboden für die Bestimmung, gezüchtet. Die *Mucorineen* dagegen, die darauf schlecht fruktifizieren, wurden zum Mikroskopieren auf dem von ZYCHA angegebenen Malzpeptonagar kultiviert. Zur sicheren Bestimmung der *Penicillien*, *Mucorineen* und *Fusarien* mußten auch die Habitusbilder in PETRI-Schalen herangezogen werden. Dies wurde für *Muc.* und *Fus.* auf Malzagar, für die *Pen.* auf SOPPs Fleischagar durchgeführt.

### B. Ergebnisse.

#### I. Die gefundenen Gemeinschaften von Schimmelpilzen.

Die isolierten Mikroorganismen konnten nicht immer sicher bis zur Art bestimmt werden, doch ist die Gattung stets zu ermitteln gewesen.

Folgende Gattungen wurden isoliert:

*Mucor*, *Zygorhynchus*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Botrytis*, *Monilia*, *Geotrichum*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*, *Sporotrichum*, *Acremonium*, *Verticillium*, *Cephalothecium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Synsporium*, *Fusarium*. Ihr Vorkommen in den einzelnen Bodenproben geht aus Tab. I hervor<sup>1</sup>.

Zur Bestimmung wurden die Werke von LINDAU, THOM, WOLLENWEBER und ZYCHA benutzt.

Zur leichteren Übersichtlichkeit sind in der Tab. I die Erdproben mit einer Buchstaben-Ziffernfolge belegt worden, die nachstehende Bedeutung hat:

1 = Sandstein, 2 = Mergel, 3 = Jurakalk, 4 = Hauptdolomit, 5 = Liasfleckenmergel, 6 = Diluviale Schichten, 7 = Löß. Die weitere Unterteilung wurde nach der kulturellen Ausnutzung durchgeführt:

A I Buchenwald	A II Nadelwald	A III Mischwald
B I Wiese	B II Weide und Matten	
C I Getreideacker	C II Kartoffelacker	C III Übriges
D I Unkultiviert	D II Vegetationsarm	D III Geröll und Felsspalten

<sup>1</sup> Ein Unterschied in der Pilzflora der verschiedenen im Keuper vorhandenen sandigen Horizonte ließ sich nicht feststellen, und auch beim Mergel lagen die Verhältnisse ähnlich.

Tabelle 1. Liste der Gemeinschaften in den verschiedenen Bodenproben.

- 1 A I: *Muc. silvaticus*, *Abs. spinosa*, *Pen. affinis*, *Pen. lanosum*, *Pen. brunneo-violaceum*, *Pen. insigne*, *Ceph. spec.*, *Spor. candidum*, *Fus. dimerum*.
- 1 A I: *Muc. spec.*, *Abs. verticillata*, *Pen. expansum*, *Ceph. spec.*, *Spor. candidum*.
- 1 A I: *Abs. spinosa*, *Pen. insigne*, *Pen. spec.*, *Bot. cinerea*, *Fus. nivale*.
- 1 A II: *Muc. spec.*, *Zyg. Vuillemini*, *Asp. niger*, *Pen. musae*, *Trich. Koningi*.
- 1 A II: *Zyg. Vuillemini*, *Abs. spinosa*, *Pen. musae*, *Pen. puberulum*, *Fus. gramineum*, *Fus. spec.*
- 1 A II: *Muc. fragilis*, *Muc. racemosus*, *Zyg. Vuillemini*, *Abs. glauca*, *Pen. expansum*, *Pen. gilvum*, *Pen. brunneo-violaceum*, *Pen. insigne*.
- 1 A III: *Muc. varians*, *Muc. racemosus*, *Pen. affine*, *Pen. spec.* Gruppe *Fasciculata*, *Ceph. spec.*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. dimerum*.
- 1 A III: *Muc. spec.*, *Abs. spinosa*, *Pen. tuniculosum*, *Ceph. spec.*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. avenaceum*, *Fus. nivale*.
- 1 A III: *Abs. spinosa*, *Pen. gilvum*, *Pen. insigne*, *Vert. punicum*, *Clad. herbarum*, *Fus. nivale*.
- 1 B I: *Abs. glauca*, *Pen. insigne*, *Mon. sitophila*, *Fus. lateritium*.
- 1 B I: *Rhiz. nigricans*, *Abs. glauca*, *Ceph. spec.*, *Trich. Koningi*, *Fus. semitectum*, *Fus. lactis*, *Fus. spec.* Gruppe *Elegans*.
- 1 B II: *Muc. spec.*, *Pen. insigne*, *Fus. sambucinum*, *Fus. sporotrichioides*.
- 1 C I: *Rhiz. nigricans*, *Pen. insigne*, *Ceph. spec.*, *Trich. Koningi*, *Fus. merismoides*, *Fus. spec.*
- 1 C I: *Pen. insigne*, *Fus. bulbigenum*, *Fus. nivale*.
- 1 C II: *Muc. silvaticus*, *Muc. spec.*, *Pen. viridicatum*, *Fus. lateritium*, *Fus. expansum*, *Fus. spec.*
- 1 C II: *Fus. nivale*, *Fus. solani*, *Fus. moniliforme*.
- 1 C II: *Ceph. spec.*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. dimerum*, *Fus. sambucinum*, *Fus. lateritium*.
- 1 C III: *Pen. insigne*, *Ceph. spec.*, *Vert. cinnabarinum*, *Syn. biguttatum*, *Fus. poae*.
- 1 D I: *Muc. spec.*, *Rhiz. nigricans*, *Ceph. spec.*, *Fus. solani*, *Fus. poae*.
- 1 D I: *Muc. hiemalis*, *Zyg. Vuillemini*, *Pen. griseus*, *Pen. insigne*, *Fus. nivale*, *Fus. graminum*, *Fus. buxicola*.
- 1 D I: *Pen. expansum*, *Pen. insigne*, *Trich. Koningi*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. nivale*, *Fus. melanochlorum*.
- 1 D I: *Pen. flavo-glaucum*, *Pen. insigne*, *Trich. Koningi*, *Vert. punicum*.
- 1 D II: *Muc. hiemalis*, *Muc. spec.*, *Abs. spinosa*, *Fus. spec.*
- 1 D II: *Muc. varians*, *Clad. herbarum*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. avenaceum*, *Fus. melanochlorum*.
- 1 D II: *Muc. spec.*
- 1 D III: *Ceph. spec.*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. moniliforme*, *Fus. chlamydosporum*.
- 2 A I: *Abs. spinosa*, *Pen. spec.*
- 2 A II: *Abs. verticillata*, *Zyg. Vuillemini*, *Pen. insigne*, *Pen. spec.* Gruppe *Fasciculata*.
- 2 A III: *Muc. spec.*, *Pen. insigne*, *Fus. lactis*.
- 2 B I: *Muc. spec.*, *Cun. elegans*, *Ceph. spec.* *Trich. Koningi*, *Vert. cinnabarinum*, *Pen. Duclauxii*, *Pen. Gruppe Asymmetricum*, *Fus. lactis*, *Fus. merismoides*, *Fus. spec.*
- 2 B I: *Muc. spinosus*, *Cun. elegans*, *Abs. glauca*, *Pen. insigne*, *Pen. spec.*, *Ceph. spec.*, *Fus. dimerum*, *Fus. lateritium*, *Fus. moniliforme*.
- 2 B I: *Fus. sporotrichioides*, *Fus. argillaceum*.
- 2 C I: *Muc. spec.*, *Fus. solani*.
- 2 C I: *Trich. Koningi*, *Fus. dimerum*, *Fus. poae*, *Fus. sambucinum*.



Tabelle 1. (Fortsetzung.)

- 2 C II: *Fus. spec.*  
 2 C II: *Muc. spec.*, *Pen. insigne*, *Fus. spec.*  
 2 C III: *Fus. dimerum*, *Fus. spec.*  
 2 C III: *Rhiz. Cohnii*, *Fus. solani*.  
 2 C III: *Rhiz. nigricans*, *Pen. insigne*, *Mon. sitophila*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. sambucinum*, *Fus. argillaceum*.  
 2 D I: *Asp. terreus*, *Pen. spec.* Gruppe *Monoverticillium*, *Pen. expansum*, *Geotr. candidum*, *Ceph. curticeps*, *Fus. dimerum*, *Fus. lactis*, *Fus. nivale*.  
 2 D I: *Muc. hiemalis*, *Muc. racemosus*, *Fus. solani*.  
 2 D I: *Rhiz. nigricans*, *Fus. nivale*.  
 2 D II: *Pen. lanosum*, *Pen. Duclauxii*, *Pen. insigne*, *Fus. semitectum*.  
 2 D II: *Cun. elegans*, *Pen. crassum*, *Pen. insigne*, *Fus. moniliforme*.  
 2 D III: *Muc. spec.*, *Pen. ochraceum*, *Pen. spec.*, *Fus. spec.*  
 3 A I: *Muc. hiemalis*, *Pen. flavo-glaucum*, *Vert. punicum*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. dimerum*, *Fus. argillaceum*.  
 3 A II: *Muc. spec.*, *Pen. insigne*, *Pen. spec.*, *Synsp. biguttatum*, *Fus. dimerum*, *Fus. lactis*, *Fus. spec.*  
 3 A III: *Muc. spinosus*, *Abs. Lichtheimi*, *Pen. gilvum*, *Pen. insigne*, *Fus. spec.*  
 3 B I: *Fus. spec.* Gruppe *Gibbosum*, *Fus. spec.*  
 3 C I: *Muc. silvaticus*, *Rhiz. nigricans*, *Rhiz. arrhizus*, *Pen. spec.*, *Fus. dimerum*.  
 3 C II: *Muc. hiemalis*, *Muc. silvaticus*, *Ceph. curticeps*, *Fus. merismoides*, *Fus. equiseti*.  
 3 D I: *Muc. spinosus*, *Muc. silvaticus*, *Pen. insigne*, *Ceph. spec.*, *Fus. lateritium*.  
 3 D I: *Muc. spinosus*, *Muc. silvaticus*, *Pen. insigne*, *Ceph. spec.*, *Fus. lateritium*, *Fus. nivale*, *Fus. poae*, *Fus. solani*.  
 4 B: *Muc. silvaticus*, *Pen. flavo-glaucum*, *Pen. spec.*  
 4 B II: *Pen. insigne*, *Ceph. spec.*, *Fus. aquaeductum*, *Fus. solani*.  
 4 B II: *Muc. hiemalis*, *Pen. Duclauxii*, *Ceph. spec.*, *Fus. lateritium*, *Fus. solani*.  
 4 D I: *Muc. spec.*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. aquaeductum*, *Fus. spec.*  
 4 D I: *Muc. spec.*, *Pen. intricatum*, *Pen. spec.*, *Fus. dimerum*, *Fus. sambucinum*.  
 4 D II: *Pen. suaveolens*, *Pen. expansum*, *Pen. luteo-viride*, *Cephalot. roseum*, *Fus. spec.*  
 4 D II: *Muc. spec.*, *Fus. spec.*  
 4 D III: *Pen. gilvum*, *Fus. merismoides*.  
 4 D III: *Fus. melanochlorum*, *Fus. spec.*  
 5 B I: *Muc. hiemalis*, *Muc. silvaticus*, *Pen. insigne*, *Vert. asperum*, *Fus. aquaeductum*, *Fus. dimerum*, *Fus. merismoides*, *Fus. solani*.  
 5 B II: *Muc. hiemalis*, *Muc. silvaticus*, *Fus. nivale*.  
 5 B II: *Muc. hiemalis*, *Pen. corymbiferum*, *Pen. brunneo-violaceum*, *Cephalot. roseum*, *Fus. lactis*.  
 5 D I: *Muc. hiemalis*, *Pen. commune*, *Pen. expansum*, *Pen. luteo-viride*, *Cephalot. roseum*, *Fus. poae*.  
 5 D I: *Pen. insigne*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. solani*.  
 5 D II: *Muc. hiemalis*, *Pen. spec.*, *Fus. bulbigenum*.  
 6 A II: *Muc. hiemalis*, *Vert. cinnabarinum*.  
 6 A III: *Muc. hiemalis*, *Pen. insigne*, *Clad. herbarum*, *Vert. glaucum*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. merismoides*.  
 6 B I: *Muc. silvaticus*, *Pen. aurintio-griseum*, *Pen. spec.* Gruppe *Fasciculata*, *Pen. insigne*, *Trich. Koningi*, *Vert. cinnabarinum*, *Fus. solani*, *Fus. camptoceras*, *Fus. spec.*  
 6 B I: *Muc. spec.*, *Pen. insigne*, *Fus. solani*, *Fus. oxysporum*, *Fus. argillaceum*.

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

6 B II:	<i>Fus. dimerum</i> , <i>Fus. solani</i> .
6 B II:	<i>Pen. spec.</i> , <i>Pen. spec.</i> , <i>Fus. oxysporum</i> , <i>Fus. solani</i> .
7 B I:	<i>Scop. brevicaulis</i> , <i>Fus. sambucinum</i> , <i>Fus. camptoceras</i> .
7 C I:	<i>Scop. brevicaulis</i> , <i>Mon. sitophila</i> , <i>Geotr. candidum</i> , <i>Alt. tenuis</i> , <i>Fus. lateritium</i> , <i>Fus. solani</i> .
7 C II:	<i>Muc. silvaticus</i> , <i>Asp. terreus</i> , <i>Scop. brevicaulis</i> , <i>Geotr. candidum</i> .
7 C III:	<i>Rhiz. nigricans</i> , <i>Pen. commune</i> , <i>Geotr. candidum</i> , <i>Fus. merismoides</i> , <i>Fus. culmorum</i> , <i>Fus. nivale</i> .
7 C III:	<i>Fus. dimerum</i> , <i>Fus. gramineum</i> , <i>Fus. sambucinum</i> .
7 D I:	<i>Muc. hiemalis</i> , <i>Geotr. candidum</i> , <i>Fus. nivale</i> , <i>Fus. solani</i> .

## II. Physiologische Leistungen auf verschiedenen Substraten.

Die Verwertbarkeit von einigen Substanzen, die die Pilze in ihrer natürlichen Umgebung, dem Boden, vorfinden, wurde durch Wachstumsversuche geprüft. Nach WAKSMAN (1944) soll die erste Stufe des mikrobiellen Abbaus von Pilzen durchgeführt werden. Die Endprodukte ihrer Umsetzungen und auch die Pilzhyphe selbst dienen dann den Bakterien als Substrate. Geprüft wurde das Wachstum auf einigen im Boden häufigen pflanzlichen Abfallprodukten und anderen Pflanzenstoffen. Daneben wurde noch das Wachstum der Schimmelpilze auf sterilisiertem Boden untersucht.

Der Abbau der pflanzlichen Materialien ist ein komplexer Vorgang, bei dem mehrere Mikroorganismen zusammenarbeiten, jeder baut das Endprodukt des Abbaus seines Vorgängers weiter ab. Bei der Zerstörung von pflanzlichen Geweben wird zunächst der Zusammenhalt der einzelnen Zellen gelockert und gelöst, nämlich die aus Calciumpectinat bestehende Mittellamelle. Die Pectinzerstörer machen so den Weg frei für die celluloseabbauenden Mikroorganismen. Daraufhin können die Substanzen des Zellinneren angegriffen werden, soweit sie nicht schon vor dem Absterben der Pflanzenteile von der Pflanze resorbiert worden sind. Eiweiß und sonstige plasmatische Bestandteile aber sind nicht mehr so schwer angreifbar für Mikroorganismen wie die sie umhüllenden Stoffe, sie werden nun sehr rasch, und zwar hauptsächlich von Bakterien abgebaut. Eiweiß und die Zwischenprodukte seines Abbaus sind für fast alle Pilze als Nährstoffquelle geeignet, wird doch z. B. Pepton für sehr viele synthetische Nährböden verwendet. Auch Kohlehydrate, und von ihnen vor allem die Oligosaccharide, sind leicht abbaubar.

Wie Tab. 2 zeigt, sind alle gebotenen natürlichen Pflanzenstoffe für Schimmelpilze gut verwertbar. Auf *Laub*, auch in der Form von *Nadeln*, war das Wachstum durchweg gut. Frisches *Holz* dagegen war als Substrat weniger geeignet; die Cellulose kann in ihm nur schwer angegriffen werden, da verschiedene, nicht genau definierte Substanzen noch wirksam sind, die die verholzten und daher zum Teil schon abgestorbenen Gewebe im Leben der Pflanze vor dem Angriff der Mikroorganismen schützen. Fast alle untersuchten Schimmelpilze besitzen das Ferment Pectinase; besonders gut arbeiten bei der *Pectin*zersetzung die *Plectascales* und auch die *Fusarien*.

Tabelle 2. Wachstum von Schimmelpilzen auf einigen Substraten natürlicher Standorte.  
Wachstum: +++++ = üppig, +++ = gut, ++ = mäßig, + = schwach, · = sehr schwach, — = kein Wachstum.

Art des Schimmelpilzes	Con- feren- nadeln	Laub	Mor- sches Holz	Säge- mehl	Pectin	Cellu- lose	Tannin	Harnstoff als	
								N- Quelle	C- Quelle
<i>Muc. silv.</i> . .	+++++	+++++	+++	++	+++++	—	—	—	+++
<i>Muc. hiem.</i> . .	+++++	+++++	+++	++++	+++++	—	—	—	+++++
<i>Muc. frag.</i> . .	+++	+++++	+++	++	+	—	—	—	+++
<i>Muc. spin.</i> . .	+++	++	+++	+	++	—	—	—	+++++
<i>Rhiz. nigr.</i> . .	+++++	+++	+++	—	—	—	—	—	—
<i>Abs. glauc.</i> . .	+++	++	+++	+	+++++	—	—	—	++
<i>Abs. spin.</i> . .	++	+++	++	++	+++	—	—	—	+
<i>Cun. eleg.</i> . .	+++++	+++	+	++	++	—	—	—	++
<i>Asp. niger.</i> . .	++++	+++	+++++	++	+++++	++	+++	—	++
<i>Asp. terr.</i> . .	+++	++	+++	++	+++++	+	+	·	+++++
<i>Pen. virid.</i> . .	+++++	+++	+++	++	+++++	++	+++	+	+++
<i>Pen. musae.</i> . .	+++++	+++++	+++	++	+++++	+	++	+	+++++
<i>Pen. gilv.</i> . .	+++++	+++++	+++	+	+++	++	++	+	+++++
<i>Pen. exp.</i> . .	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+	+++++
<i>Pen. comm.</i> . .	+++	+++++	+++++	+	+++++	++	++	—	+++
<i>Pen. suav.</i> . .	+++	+++	+++++	+	+++++	+	++	—	+++
<i>Pen. insign.</i> . .	+++	+++++	+++	+++++	+++	++	++	—	+++
<i>Scop. brev.</i> . .	+++	+++	++	++	+	++	·	—	+++++
<i>Mon. sit.</i> . .	+++++	+++	++	+	—	+++	·	—	+++
<i>Ceph. spec.</i> . .	+++	+++	++	+	+	++	—	·	++
<i>Ceph. curt.</i> . .	+++++	+++++	+++++	+	+++	++	+	—	+++++
<i>Trich. Kon.</i> . .	+++++	+++	+++++	++	+++	+++++	·	—	+
<i>Vert. pun.</i> . .	+++++	+++	+++++	++++	+++	+++	++	—	++
<i>Vert. cinn.</i> . .	+++	+	+	+	++	+++	—	—	+
<i>Ceph. ros.</i> . .	+++	+++	+++	++	+++++	+	·	—	+++++
<i>Acre. alt.</i> . .	+++++	+++	+++	++	+	—	·	—	+++++
<i>Fus. lat.</i> . .	++	++	+++	++	++	+++	—	—	+
<i>Fus. dim.</i> . .	++	++	++	++	+++	+++++	—	—	+++
<i>Fus. niv.</i> . .	+++	++	++	+	+++	+++	·	—	+++
<i>Fus. sol.</i> . .	+++++	++	+	++++	+	+++++	—	—	+++++
<i>Fus. samb.</i> . .	+++++	+++++	+++	++	++	+++++	—	—	+++

Zum Abbau des Tannins, das als einer der verschiedenen, in Pflanzen vor allem in der Borke und auch in einigen fleischigen Früchten gebildeten Gerbstoffe geboten wurde, waren nur wenige Pilze befähigt. Nach STAPP und BORTELS (1934) sind es nur Vertreter der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* und zwar der Gruppe *Monoverticillium* (früher nach WEHMER die eigene Gattung *Citromyces*). Nach eigenen Erfahrungen zeigen aber auch Vertreter der Gruppen *Asymmetricum* und sogar *Symmetricum* die Fähigkeit, Tannin zu verwerten; ganz geringe Wachstumsintensitäten auf Tannin waren auch bei *Verticillium* und

*Cephalosporium* feststellbar. Tannin in sehr hoher Konzentration (20%) wird nur von ganz wenigen *Penicillium-Monoverticillium*-Arten abgebaut. Da die Gerbstoffe im Boden aber auch nur selten und dann nur örtlich in sehr großer Menge auftreten, reicht der Gehalt der Schimmelpilze an Tannase für den Abbau des Tannins vollständig aus.

Bei *Cellulose* muß besonders gut zwischen intensivem Abbau und reinem Wachstum auf ihr unterschieden werden, wobei wohl die geringen Mengen an Verunreinigungen mit anderen Kohlenstoffquellen eine Rolle spielen. Durch die pilzliche und in noch viel stärkerem Maße durch die bakterielle Cellulosezersetzung wird die Menge der in pflanzlichen Zellwänden irreversibel abgelagerten Elemente angegriffen und abgebaut. In der natürlichen Mikrobengemischung des Bodens lassen die Pilze nach STAPP und BORTELS (1935) die Cellulose fast unberührt, wenn ihnen genügend wasserlösliche Kohlenstoffverbindungen zur Verfügung stehen. Bei keiner Art der *Phycomycetes* ist Wachstum auf Cellulose möglich.

Harnstoff ist hier als eines der vielen, im Boden vorliegenden Zwischenprodukte des Eiweißabbaus herausgegriffen worden, er ist besonders als Stickstoffquelle sehr geeignet; geringere Wachstumsintensitäten zeigten darauf nur *Trichoderma*, *Verticillium*, *Rhizopus* und *Absidia*, also Arten, die auf den übrigen Substraten gut gedeihen. Als Kohlenstoffquelle dagegen zeigte sich Harnstoff nicht sehr geeignet, nur ganz wenige Arten bildeten darauf ein schwaches Mycel; dabei sind Konzentrationen von 1 und 5% gleich ungeeignet.

Der Abbau des *Lignins* ist noch sehr umstritten, eigene Versuche in dieser Richtung wurden nicht durchgeführt. Nach WAKSMAN sollen einige *Alternaria*- und *Fusarium*-Arten etwas Lignin abbauen, aber auch dies wohl erst, nachdem die Cellulose schon zerstört ist.

Der Abbau all der genannten Substanzen verläuft im Boden gleichzeitig. Dabei sind einige Arten auf nur wenige Substrate spezialisiert, andere wieder bauen verschiedenartige Stoffe mit gleicher Intensität ab, wie sich aus diesen Versuchen zeigen ließ. So ist Tannin nur für wenige Gattungen geeignet; Cellulose wird von den *Phycomycetes* nicht angegriffen. Für den Ligninabbau sind auch nur ganz wenige *Fungi Imperfecti* geeignet.

Ein Kriterium, ob die isolierten Arten von Schimmelpilzen auch tatsächlich echte Bodenpilze darstellen oder nur durch Zufall in den Boden gelangt und erst in Kultur gekeimt sind, ist die Tatsache, ob sie auf *sterilisierter Erde* längere Zeit zu wachsen vermögen. Durch die bei der Sterilisation entwickelte Temperatur wurde der Boden in seiner organischen Komponente wohl etwas verändert, doch nicht so stark, daß sich nicht trotzdem Schlüsse aus den nun folgenden Versuchen ziehen ließen. In der Natur sind im Boden die optimalen Lebensbedingungen für Schimmelpilze nur zeitweise vorhanden, doch können sie, wenn sie auftreten, von den sehr raschwüchsigen Pilzen sofort und ziemlich weitgehend ausgenutzt werden.



Die Pilze wurden auf verschiedenen Böden gezogen, um Unterschiede in der Wachstumsintensität auf ihnen festzustellen. Dabei wurde je ein Wald- und ein Ackerboden aus Stubensandstein und Knollenmergel und zum Vergleich noch ein Waldboden aus Weißjura  $\beta$  gewählt. Es zeigte sich, daß alle untersuchten Arten auf Erde zu wachsen vermochten, wobei ihnen Waldboden meist mehr zusagte als Ackerboden.

*Penicillium*, *Mucor* und *Verticillium punicum* zeigten ein besonders intensives Wachstum mit starker, normal entwickelter Conidienbildung. *Fusarium* wuchs dünner und unregelmäßig, Makroconidien werden nur wenig gebildet. Sehr viele *Fusarium*-arten verbringen nur einen Teil ihres Lebenszyklus im Boden, der für sie nur der sekundäre Standort ist. Eine deutliche Vorliebe für Wald zeigte sich bei fast allen *Penicillien* und *Mucorineen*, auch bei *Trichoderma*. In Feldböden gediehen gern *Fusarien*, *Acremonium* und *Aspergillus terreus*. Auf der anderen Seite zeigten *Acaulium* und *Monilia* eine ganz deutliche Vorliebe für Mergel, *Cephalotaecium* und *Penicillium* für Sandstein.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluß verschiedener käuflicher Düngemittel auf die Wachstumsintensität derselben Pilze untersucht. Dabei wurde Brunnenwasser benutzt, mit 0,2% igen Lösungen der folgenden Düngemittel im Boden: Thomasmehl, Superphosphat, Kalkstickstoff, Ammoniak und Albertsdünger. Die Zugabe dieser Düngemittel wirkte verschieden auf das Wachstum der einzelnen Arten, bei einigen wurde dieses geringfügig gesteigert oder gehemmt, bei andern nicht verändert. Es ließ sich auch keine spezifische Wirkung eines bestimmten Düngemittels feststellen. Die häufige Düngung der Felder kann also nicht der Grund für das Fernbleiben einzelner Arten sein. Eher ließe sich daran denken, daß dem häufigen Umgraben ein gewisser Einfluß zukommt, wobei immer wieder die gebildete Capillarstruktur gestört wird.

### III. Ökologische Betrachtungen.

Jeder Organismus ist in seinen Lebensäußerungen sehr stark von den Einflüssen einer Umwelt abhängig. Diese lassen sich in einen klimatischen, edaphischen und biotischen Faktor gliedern. Doch sind diese drei nicht scharf voneinander abtrennbar: Das Klima wirkt sehr stark auf die edaphischen Faktoren und auch auf die biotischen ein; diese werden wiederum durch die edaphischen beeinflusst. So tritt jede ökologische Gegebenheit auch mit allen übrigen in Wechselwirkung.

#### a) Klimatische Faktoren.

Das durch die geographische Lage und die meteorologischen Verhältnisse bedingte Klima übt keinen sehr großen Einfluß auf die Zusammensetzung der Pilzflora eines kleineren Gebietes aus. Erst ein Vergleich der Arten von Schimmelpilzen, die in verschiedenen Ländern isoliert wurden, zeigt die klimatische Abhängigkeit des Vorkommens von Pilzen deutlich. So nimmt die Gattung *Penicillium* nach Süden zu an Arten und Individuen ab, *Aspergillus* dagegen zu. Auch die Zahl der *Mucorineae*

nimmt in Europa von Norden nach Süden ab. Solchen Zusammenhängen konnte natürlich bei dem kleinen Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nachgegangen werden.

Größeren Einfluß auf die Zusammensetzung der Pilzgemeinschaften besitzt das Mikroklima, das nach JANKE (1934) in den bodennahen Luftschichten herrscht. Er nennt es Kleinklima und reserviert den in der Meteorologie in diesem Sinne gebrauchten Begriff Mikroklima für die Verhältnisse in den Bodencapillaren. Das Mikroklima ist in erster Linie von der Art der Pflanzenbedeckung abhängig. Baumbewuchs schafft gleichmäßige Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnisse im Boden, die sich dem Optimum des Pilzwachstums etwas annähern. Unbewachsener Boden dagegen besitzt auf allen Gebieten des Klimas ausgeprägtere Extreme. Die obersten Bodenschichten trocknen stark aus und erhitzen sich stärker, als dem Pilzwachstum zuträglich ist. Daher nimmt in solchen Böden, im Gegensatz zu bewachsenen, die eine konstante Abnahme der Keimzahl mit der Tiefe zeigen, die Keimzahl zuerst zu. Die optimalen Bedingungen, die aber hier schon etwas ungünstiger liegen, werden dabei erst in einer gewissen Tiefe erreicht, wo die Austrocknung und Erhitzung nicht mehr so stark, der Sauerstoffmangel dagegen noch nicht fühlbar ist. Von hier aus nimmt die Keimzahl dann auch rasch mit der weiteren Tiefe ab.

Der größte Einfluß des Klimas auf die Mikroorganismen ist indirekter Natur. Es griff in der Vergangenheit und auch heute noch sehr stark gestaltend in die Bodenbildung ein und schuf damit die Umwelt für die Bodenorganismen. Das Klima arbeitet mit an der Ausbildung der Oberfläche des Bodens und auch an der Struktur der Capillarräume, in denen die Wasser- und Sauerstoffzirkulation stattfindet.

Die Exposition übt auf die Mikroorganismen nur indirekt über ihre Auswirkung als Wärme und Feuchtigkeit einen Einfluß aus.

Die vom Klima herrührenden ökologischen Einflüsse zeigen also besonders deutlich einen Zusammenhang mit dem Boden und ebenso auch die edaphischen Faktoren mit dem Klima.

Tabelle 3. Vorkommen (relative Häufigkeit) in verschiedener Meereshöhe.

	800— 1400 m	1400— 1700 m	1700— 2000 m	2000— 2200 m	2200— 2400 m	2400— 2656 m
<i>Mucor</i> . . . .	1,0	0,75	1,0	0,75	0,25	—
<i>Rhizopus</i> . . .	—	—	—	—	+	—
<i>Penicillium</i> . .	1,0	1,0	1,25	1,0	1,5	1,0
<i>Cladosporium</i> .	+	—	—	—	—	—
<i>Cephalosporium</i>	—	—	+	—	—	—
<i>Trichoderma</i> .	0,5	+	—	—	—	—
<i>Verticillium</i> . .	0,75	+	+	+	—	—
<i>Cephalothecium</i>	—	—	—	—	+	+
<i>Fusarium</i> . . .	1,25	1,75	1,75	1,25	+	+

Die Isolierungen aus der Oberstdorfer Umgebung wurden dazu benutzt, zu untersuchen, ob eine Abhängigkeit des Schimmelpilzvorkommens von der Meereshöhe festzustellen ist. Diese wirkt vor allem durch das veränderte Klima auslesend. Solchen Zusammenhängen konnte naturgemäß in der Stuttgarter Umgebung mit ihren viel zu geringen Höhenunterschieden nicht nachgegangen werden. Um vergleichbare Werte über die Häufigkeit des Auftretens in den nicht immer in gleicher Zahl entnommenen Bodenproben zu besitzen, ist in Tab. 3 die relative

Häufigkeit eingetragen, die sich aus der Zahl der isolierten Schimmelpilze, dividiert durch die Zahl der Erdproben, ergab. Ein einmaliger Fund einer Art wurde nicht in dieser relativen Häufigkeit angegeben, sondern nur durch ein Kreuz bezeichnet. Der geologische Untergrund und die Bestandsflora sind in den einzelnen aufgestellten Spalten wechselnd, so daß ihr Einfluß dabei keine große Rolle spielen kann. Um eine Abhängigkeit des Auftretens einzelner Arten festzustellen, war die Zahl der Isolierungen viel zu gering, die Gattungen konnten damit aber erfaßt werden.

Die meisten Pilzgattungen zeigten eine deutliche Abnahme der Individuenzahl mit der steigenden Höhe. Besonders ausgeprägt tritt dies bei *Mucor*, *Verticillium* und *Fusarium* hervor; auch *Trichoderma* und *Cladosporium* traten nur an den am tiefsten gelegenen Stellen auf. Bei *Penicillium* fehlte eine deutliche Reaktion der Zahl auf die Meereshöhe vollständig. *Cephalothecium* dagegen ist wohl an die höheren Lagen gebunden, es trat auf zwei Berggipfeln auf. Sichere Angaben können jedoch immer nur für die besonders häufig auftretenden Arten und Gattungen gemacht werden.

#### b) Edaphische Faktoren.

In normalen Böden, die nur selten die optimalen Bedingungen zeigen, treten die Pilze wohl vor allem in Form ihrer Dauerzustände auf, wie KUBIENA (1932) durch direkte mikroskopische Untersuchungen zeigen konnte. Sobald sich genügend Feuchtigkeit und günstige Temperatur einstellt, beginnen die Sporen und Conidien zu keimen; die nötigen Nährstoffe sind in unseren Breiten normalerweise vorhanden. Der wichtigste Faktor für den Beginn der vegetativen Phase ist dabei die relative Dampfspannung im Boden. Schimmelpilze gedeihen nach HEINTZELER (1939), wenn die Hydratur des Substrates 85% überschreitet. Die aeroben Schimmelpilze wachsen nur in der Nähe der Bodenoberfläche oder noch lieber in Bodenhohlräumen (günstigere Hydratur) der oberen Schichten; dabei können kleinere anaerobe Bezirke, so etwa wassergefüllte Capillaren, besonders wenn diese noch nährstoffreich sind, auch durchwachsen werden.

Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Vorkommen der Pilze ist bekanntlich ziemlich groß. Ganz allgemein gilt, daß in saurer Umgebung die Pilze, in neutraler oder leicht alkalischer dagegen die Bakterien überwiegen. Der Säuregrad des Bodens hält sich fast immer in einem  $p_H$ -Bereich, der für Pilzwachstum günstig ist. So stark alkalische Böden, daß die Schimmelpilze zurückgedrängt würden, treten in dem untersuchten Gebiet nicht auf. Bei *Zygorhynchus*, *Absidia*, *Trichoderma*, *Cephalosporium* und *Verticillium* ließ sich eine gewisse Vorliebe für höhere Säuregrade feststellen. *Cunninghamella* und *Monilia* bevorzugten ein etwas stärker dem Neutralpunkt genähertes  $p_H$ . Die in der Natur am weitesten verbreiteten Arten *Mucor*, *Penicillium* und *Fusarium* zeigten keine so enge Abhängigkeit; darauf beruht wohl auch ihre große Verbreitung in den verschiedenartigsten Böden.



Die Mikroorganismen zeigen in ihrem Vorkommen eine gewisse Abhängigkeit vom *geologischen Untergrund*; zwar nicht so eindeutig, daß einzelne Arten auf einem bestimmten Boden gar nicht vorkommen, doch gewisse Vorlieben lassen sich feststellen. Die meisten Gattungen zeigten eine, wenn auch teilweise nur geringe Vorliebe für den Sandstein. Dies hat wahrscheinlich seinen Grund in dem für Pilze zusagenderen  $p_H$ ; am deutlichsten tritt dies bei *Mucor*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Penicillium* und *Cladosporium* hervor. Größere Häufigkeit im Mergel zeigte *Cunninghamella*, die bei unseren Isolierungen ganz auf diesen beschränkt blieb. Die aus dem Boden isolierten Arten sind nicht immer reine Bodenpilze, für einige ist der Boden nur sekundärer Standort, in dem sie nur einen Teil ihres Lebenszyklus verbringen. Meist sind es dann die Dauerformen, die im Boden vorliegen. Diese keimen, im Gegensatz zu echten Bodenpilzen, auch bei günstiger Hydratur nur selten aus. Erst wenn sie durch Zufall auf das ihnen zusagende Substrat gelangen (hier der Nährboden der Rohkultur), erwachen sie wieder zu aktiver Lebenstätigkeit.

#### c) *Biotische Faktoren.*

Die Gemeinschaften der Mikroorganismen stehen in einem gewissen Zusammenhang mit der *Bestandsflora von höheren Pflanzen*. Dabei darf aber nicht an einen ganz direkten Zusammenhang gedacht werden, daß also eine bestimmte Pflanze immer mit bestimmten Mikroorganismen gemeinsam vorkäme. Aber einzelne Gattungen und Arten zeigen eine gewisse Vorliebe für Gemeinschaften von höheren Pflanzen. Vielleicht spielen aber dabei die physikalischen Beeinflussungen durch die Flora eine größere Rolle, so etwa durch ihre Beschattung. Eine deutliche Bevorzugung des Waldes ließ sich für *Mucor*, *Absidia* und *Penicillium* feststellen. *Aspergillus* und *Fusarium* dagegen sind in offenem Gelände, besonders Feldern und Wiesen, sehr häufig; *Fusarium* ist überhaupt die weitaus am häufigsten aufgetretene Gattung. Dies hängt vielleicht damit zusammen, daß ein Teil der Arten dieser Gattung deutlich pflanzenpathogene Wirkungen zeigt und die Kulturpflanzen anfälliger gegen sie sind als die wilden Pflanzen; denn im Ödland sind sie viel seltener, obwohl dort die ökologischen Verhältnisse ganz ähnlich sind wie auf dem angebauten Gelände. Auch *Trichoderma* trat in Ackerböden etwas häufiger auf, als in den übrigen; im Wald dagegen ausgesprochen selten, obwohl sie säureliebend sein soll.

Die *Wirkung von Pilzen auf Bakterien und umgekehrt* ist ein Kampf um den Lebensraum. Die am leichtesten zugänglichen Nährstoffe werden von beiden abgebaut. Die mit Hilfe von verschiedenen Testen untersuchte antibiotische Wirkung von Pilzen auf pathogene Bakterien spielt auch in der Praxis eine große Rolle. Hier soll aber nicht die antibiotische Wirksamkeit gegen die allgemein geprüften Testorganismen (*Staphylococcus*



*aureus*, *Escherichia coli* und *Bacillus mesentericus*) untersucht werden, sondern das Verhalten der Pilze gegen Bakterien, mit denen sie in ihrer natürlichen Umwelt, dem Boden, zusammenleben. Die Tests wurden als Strichtest nach FLEMING (1946) durchgeführt.

Tabelle 4. Einfluß von Schimmelpilzen auf 5 nicht bestimmte Bodenbakterien.

— = Abtötung des Bakteriums beim Überwachsen.

+ = Keine Hemmung des Bakteriums, es wächst unter der Pilzdecke schwach weiter.

Hemmzone in mm angegeben.

Pilzart	Nummer des Bakt.				
	1	2	3	4	5
<i>Muc. spinosus</i> . . . . .	+	+	+	—	+
<i>Muc. silvaticus</i> . . . . .	+	—	+	—	+
<i>Muc. hiemalis</i> . . . . .	+	—	+	—	—
<i>Rhiz. nigricans</i> . . . . .	+	—	—	+	+
<i>Abs. spinosa</i> . . . . .	+	—	—	+	—
<i>Abs. glauca</i> . . . . .	+	+	+	+	—
<i>Cunn. elegans</i> . . . . .	—	—	—	—	—
<i>Asp. terreus</i> . . . . .	—	2	—	+	1
<i>Pen. affinis</i> . . . . .	4	7	9	2	7
<i>Pen. commune</i> . . . . .	+	—	—	—	+
<i>Pen. commune</i> . . . . .	—	+	—	—	—
<i>Pen. ochraceum</i> . . . . .	4	+	—	—	2
<i>Pen. lanosum</i> . . . . .	4	—	—	+	—
<i>Pen. lanosum</i> . . . . .	—	—	+	+	2
<i>Pen. flavo-glaucum</i> . . . . .	—	—	—	+	—
<i>Pen. flavo-glaucum</i> . . . . .	12	35	23	+	2
<i>Pen. expansum</i> . . . . .	3	32	35	—	8
<i>Pen. expansum</i> . . . . .	8	20	38	6	—
<i>Pen. expansum</i> . . . . .	5	—	—	+	—
<i>Pen. corymbiferum</i> . . . . .	—	14	27	6	8
<i>Pen. gilvum</i> . . . . .	+	—	—	—	2
<i>Pen. luteo-viride</i> . . . . .	—	—	2	+	4
<i>Pen. brunneo-violaceum</i> . . . . .	+	3	3	+	—
<i>Pen. insigne</i> . . . . .	+	—	—	+	—
<i>Scop. brevicaulis</i> . . . . .	—	1	2	+	—
<i>Mon. sitophila</i> . . . . .	5	6	+	7	4
<i>Trich. Koningi</i> . . . . .	20	18	—	+	12
<i>Vert. punicum</i> . . . . .	—	6	3	—	2
<i>Acrem. alternatum</i> . . . . .	+	—	—	+	—
<i>Fus. dimerum</i> . . . . .	—	1	+	+	+
<i>Fus. nivale</i> . . . . .	22	10	14	10	19
<i>Fus. sambucinum</i> . . . . .	—	—	—	—	—
<i>Fus. lateritium</i> . . . . .	—	3	+	—	+
<i>Fus. solani</i> . . . . .	—	1	+	+	—

Die Hemmwirkung (Tab. 4) war bei einzelnen Arten sehr ausgeprägt (*Penicillium*, *Trichoderma* und einzelne *Fusarium*arten; bei den *Penicillium*arten der Gruppe *Fasciculata* *Penicillium expansum*, *P.*

*corymbiferum* und *P. luteo-viride* zeigten sich besonders starke Hemmwirkungen). Die *Mucorineae* dagegen bilden gar keine Hemmzone aus.

Pilze können ihre Hemmwirkung nun nicht nur auf Bakterien ausüben, ihre Antibiotica sind vielmehr auch gegen andere Pilze wirksam. Neben der chemischen Bekämpfung durch antibiotische Stoffe ist eine zweite Art der Ausschaltung von Rivalen unter den Pilzen vielleicht noch weiter verbreitet, nämlich die Überwachsung des anderen. Dieses Überwuchern war in unseren eigenen Versuchen vor allem bei Arten verbreitet, denen die Fähigkeit abgeht, antibiotische Stoffe abzuscheiden. Bei einigen Arten der Gattung *Fusarium* sind diese beiden Prinzipien kombiniert. Es sind im großen und ganzen dieselben Gattungen, die Hemmung gegen andere Pilze wie auch gegen Bakterien zeigen (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, einige *Fusarien*).

Die einzelnen ökologischen Faktoren wirken auf die Schimmelpilze, und natürlich auch auf alle anderen Lebewesen, zu gleicher Zeit ein. Keiner ist von so dominierendem Einfluß, daß er die Art und die Zahl der Keime eindeutig in einer bestimmten Richtung beeinflussen könnte. Die einzelnen Faktoren können sich in ihrer Wirkung auch gegenseitig überlagern oder sogar aufheben, so daß es schwer ist, sie einzeln festzustellen.

### Zusammenfassung.

Aus Sandstein- und Mergelböden der Stuttgarter Umgebung, zum Vergleich auch aus Jurakalk und alpinen Böden des Allgäus wurden 21 Gattungen mit 71 Arten von Schimmelpilzen in 527 Stämmen isoliert und, soweit es möglich war, bis zur Art bestimmt. Neue Arten wurden dabei nicht aufgestellt. Eine Art der Gattung *Cephalosporium* konnte mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Literatur nicht identifiziert werden; von einer Neubenennung wurde aber Abstand genommen, da diese Art trotzdem wahrscheinlich schon bekannt ist.

Es wurde untersucht, welchen Anteil die Pilze an der Rückführung der pflanzlichen Substanzen in den allgemeinen Kreislauf der Stoffe haben. Auf Pflanzenteilen wuchsen fast alle Schimmelpilzarten; für einige rein pflanzliche Substanzen, nämlich Tannin, Cellulose, Pectin und Harnstoff zeigten sich einige Pilzarten besonders angepaßt, andere waren nicht so stark spezialisiert. Die abbauende Wirkung der Pilze ist nicht so intensiv wie die der Bakterien; eine ganz rasche Zersetzung des Substrates tritt selten ein. Die Tätigkeit der Pilze in der Natur ist wohl vor allem wichtig zum Aufschluß der schwer zersetzbaren Substanzen.

Die Versuche über das Wachstum auf sterilem Boden ergaben, daß die Pilze auch auf anderen Böden, als denen, aus denen sie isoliert wurden, gedeihen können, und zwar teils besser, teils schlechter als auf ihrem Ursprungsboden. Eine ganz enge Anpassung an eine bestimmte Bodenart besteht also nicht.

Die ökologischen Faktoren beeinflussen die Zusammensetzung der Schimmelpilzflora kaum so stark, daß sich deutliche Abhängigkeiten zeigen, sie überlagern sich teilweise gegenseitig. Einigermassen deutlich war eine Abhängigkeit von der Bestandsflora, von der Meereshöhe und vom  $p_H$  festzustellen.

Antagonismus gegen nicht bestimmte Bodenbakterien und gegen die Pilze des Bodens wurde geprüft. Es fiel dabei auf, daß sehr viele Arten der isolierten Schimmelpilze in geringem Maße antagonistisch wirken; eine so starke Wirksamkeit, daß sie praktisch ausnutzbar wäre, konnte aber nirgends festgestellt werden.

### Literatur.

- FLEMING, A.: Penicillin, Butterworth & Co., London 1946. — HEINTZELER, J.: Arch. Mikrob. **10**, 92 (1939). — JANKE, A., F. SEKERA u. A. V. SZILVINYI: Arch. Mikrob. **5**, 223 (1934). — JANKE, A., u. M. WOZAK: Arch. Mikrob. **5**, 338 (1934). — JANKE, A., u. H. HOLZER: Zbl. Bakter. II, **79**, 50 (1935). — KUBIENA, W.: Arch. Mikrob. **3**, 507 (1932). — LINDAU: Fungi Imperfecti. In Rabenhorsts Cryptogamenflora Deutschlands, Band **8** und **9**. Leipzig 1907. — NIETHAMMER, A.: Arch. Mikrob. **4**, 72 (1933); Z. Pflanzenkrkh. **45**, 241 (1935); Die mikroskopischen Bodenpilze. s'Gravenhage 1937.; Arch. Mikrob. **13**, 60 (1942); Technische Mykologie. Stuttgart 1948. — STAPP, C., u. H. BORTELS: Zbl. Bakter. II, **90**, 28 (1934); **93**, 45 (1935). — SARC, A.: Arch. Mikrob. **12**, 329 (1942). — SZILVINYI, A. V.: Zbl. Bakter. II, **103**, 248 (1940). — THOM, CH.: The Penicillia. London 1930. — WOLLENWEBER u. REINKING: Die Fusarien. Berlin 1935. — WAKSMAN, S. A.: Soil Sci. **58**, 2 (1944). — ZYCHA, H.: Die Mucorineae. Cryptogamenflora der Mark Brandenburg, Band **6a**. Leipzig 1935.

Aus dem Technologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim.  
(Dir. Prof. Dr. M. RÜDIGER.)

## Beitrag zur Kenntnis des Acroleins in Obstbränden, Maischen und Mosten.

2. Mitteilung.

### Isolierung acroleinbildender Mikroorganismen und Erzeugung von Acrolein durch die gewonnenen Reinkulturen.

Von

G. WILHARM und G. HOLZ.

(Eingegangen am 23. Januar 1950.)

Acrolein, ein ungesättigter Aldehyd ( $\text{CH}_2 : \text{CH} \cdot \text{CHO}$ ), dessen gelegentliches Vorkommen in alkoholischen Getränken schon seit langem bekannt ist, macht sich durch einen stark zu Tränen reizenden Geruch bemerkbar. Gleichzeitig verleiht er dem Branntwein einen an Meerrettich erinnernden Geschmack. Beim Abbrennen von Obstmosten und Maischen kann unter Umständen der Geruch so stark werden, daß er den Brenner zum Verlassen der Betriebsräume zwingt.

E. VOISENET (1918) hat in einer Reihe von Arbeiten Acrolein als Ursache für das Bitterwerden von Burgunderweinen erkannt. Ihm gelang auch die Isolierung eines fakultativ aeroben Mikroorganismus, den er *Bacillus amaracrylus* nannte. Dieser *Bacillus* soll der *Typhus-Coli*gruppe angehören, jedoch nicht pathogen sein und Glycerin durch Wasserentzug zerstören (LEHMANN-NEUMANN, 1927).

F. B. HUMPHREYS (1924) berichtet über die Bildung von Acrolein aus Glycerin durch *Bac. Welchii*. Später haben WARCOLIER u. Mitarb. (1932, 1934) in Apfel- und Birnenweinen sowie den daraus hergestellten Branntweinen bedeutende Mengen Acrolein gefunden und ein den Essigbakterien ähnliches Stäbchen, jedoch von unregelmäßigerer Gestalt, isolieren können. Um bereits das Auftreten von Acrolein zu vermeiden, schlugen sie gründliches Waschen des zu verwendenden Obstes zur Befreiung von anhaftender Erde, sowie sterile Behandlung des gewonnenen Saftes vor und warnen weiterhin vor einer schleppenden Gärung.

In neuerer Zeit berichten H. REYNOLDS u. Mitarb. (1939) über das Vorkommen von Acrolein als Zwischenprodukt der Glyceringärung, hervorgerufen durch Bakterien der *Coli-Aerogenes*gruppe.

An Hand der Analyseingänge unseres Institutes konnten wir feststellen, daß in jedem Jahre beträchtliche Mengen acroleinhaltiger Obstmoste und -brände erzeugt werden. Wir konnten auch das Auftreten von Acrolein in Branntweinen aus Trestern, Kernobstmaischen, unreifem Obst, in einzelnen Fällen auch in solchem aus Rüben, Himbeersaft und Topinamburknollen beobachten. Im Jahre 1947 war der Eingang an acroleinhaltigen Obstbranntweinproben und diesbezüglichen Anfragen besonders groß, so daß wir uns zu umfangreichen Untersuchungen über das gesamte Problem entschlossen.

Der erste Teil unserer Arbeit führte zu einer Klärung der Bindungsverhältnisse des Acroleins gegenüber Alkohol und Wasser, worüber wir an



anderer Stelle berichteten (HOLZ u. WILHARM, 1950). Wir fanden auch einen Weg zur Beseitigung des Acroleins aus Obstbränden, sowie eine Behandlungsweise für Obstmaischen und Moste zur Gewinnung eines acroleinfreien Branntweines. Leider bringt die von uns gefundene Methodik eine Minderung wertvoller Aromastoffe mit sich. Deswegen erschien es uns, schon aus wirtschaftlichen Gründen, dringend notwendig, die von anderen Autoren beschriebene bakterielle Bildungsweise auch unsererseits näher zu studieren und, wenn möglich, einen Weg zu finden, um das Auftreten des Acroleins durch vorbeugende Maßnahmen zumindest einzudämmen.

Der von G. WARCOLLIER isolierte, den Essigstäbchen ähnliche Mikroorganismus vermehrte sich nach seinen Angaben gut in gezuckertem Hefewasser vom  $p_H$  6,5. Impft man diese vermehrten Bakterien in nicht gezuckertes, mit Glycerin versetztes saures Hefewasser vom  $p_H$  6,5, so bildet sich nach 12 Tagen Acrolein. In alkalischem, nicht gezuckertem, jedoch mit Glycerin versetztem Hefewasser vom  $p_H$  8,0, bildeten seine Bakterien ebenfalls Acrolein, wobei gleichzeitig eine  $p_H$ -Verschiebung nach der sauren Seite eintrat. In der Zusammenfassung seiner Arbeit bespricht nun WARCOLLIER zwar die Bildung des Acroleins durch seine Bakterien bei  $p_H$  6—8, gibt jedoch keine Erklärung, wie diese in natürlichem Apfel- oder Birnensaft ( $p_H$  etwa 3,6—4,0) zustande kommen soll. Eine gewisse Unklarheit entsteht auch dadurch, daß er abwechselnd von „Bakterien“ und „Bacillen“ spricht. Auch die übrigen zitierten Autoren arbeiteten nicht mit natürlichen Substraten.

## I. Experimenteller Teil.

### a) Züchtung von *Bacillus*-Stamm I und II sowie einige morphologische Daten.

In Anlehnung an die Arbeiten WARCOLLIERS versuchten wir nun, aus einer größeren Zahl von eingesandten Mosten, acroleinbildende Bakterien zu isolieren.

Wir zentrifugierten die Moste und legten aus dem Bodensatz Platten an. Hierzu benutzten wir den von WARCOLLIER angegebenen Nährboden: 50 g Glucose, 0,25 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,25 g  $K_2HPO_4$ , eine Spur  $MgSO_4$ , 1000 cm<sup>3</sup> 10%iges Hefewasser, 2% Agar.

Neben einzelnen Bakterienkolonien wuchsen auf diesen Platten hauptsächlich Schimmelpilze, so daß eine Isolierung, auch nach Anlegung größerer Verdünnungen nicht gelang. Das morphologische Bild der Mikroorganismen ließ jedoch die Vermutung zu, daß es sich um Sporenbildner handeln könne. Wir schwemmten daher die Platten mit sterilem Wasser ab und pasteurisierten die Abschwemmung  $\frac{1}{4}$  Std bei 75° C. Hiervon wurden Verdünnungen (1 : 100—1 : 100 000) angelegt und die Platten bei 25° C bebrütet.

Die Platten der Verdünnungen 1 : 10 000 und 1 : 100 000 ließen 4 verschieden aussehende Kolonien deutlich erkennen: 1. Fläche, weiße

Kolonien, opalisierend und einen dünnen Film an der Oberfläche bildend.  
2. Erhöhte, glatte, glänzend-schleimige, undurchsichtige Kolonien.  
3. Kleine weiße Kolonien in der Agarschicht liegend. 4. Flache weiße Kolonien, opalisierend in der Agarschicht liegend. Nach mehreren Passagen unserer von den Platten gewonnenen Kulturen stellten wir fest, daß es sich nur um 2 Arten der Gattung *Bacillus* handelt, die sowohl aerob, wie anaerob zu wachsen vermögen.

Es wurde weiterhin ermittelt, daß die Organismen der unter 1. beschriebenen Kolonien mit denen der Nr. 4 identisch sind. Desgleichen sind die unter Nr. 2 und Nr. 3 aufgeführten identisch. Wir werden diese beiden Arten im folgenden mit Stamm I und Stamm II bezeichnen.

Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß auch alle übrigen im weiteren Verlauf der Arbeit uns zur Untersuchung eingesandten acroleinhaltigen Moste und Maischen nur die oben beschriebenen *Bacillus*-Arten enthielten. Sie scheinen also, zumindest im Gebiet Württemberg-Badens, die dominierenden zu sein. Daß neben diesen auch andere Mikroorganismen Acrolein als Stoffwechselprodukt zu bilden vermögen, soll nicht in Abrede gestellt werden.

In Abwandlung der Methode WARCOLLIERS, der als flüssigen Nährboden Hefe- oder Bohnenwasser verwendete, arbeiteten wir zunächst mit Apfelwein, später mit Apfelsaft. Um festzustellen, ob unsere beiden Stämme Acroleinbildner sind, prüften wir sie wie folgt: Wir impften je 100 cm<sup>3</sup> Apfelwein, dem wir 0,25 cm<sup>3</sup> Glycerin zusetzten und bei dem das p<sub>H</sub> mit NaOH auf 8,0 eingestellt wurde, mit Stamm I und II. Nach 15tägiger Bebrütung bei 25° C hatte sich bei Stamm I das p<sub>H</sub> auf 7,0 und bei Stamm II auf 7,4 verschoben. Im Destillat beider Ansätze konnte Acrolein nachgewiesen werden.

Um in morphologischer Hinsicht einen gewissen Überblick zu erhalten, prüften wir das Wachstum unserer beiden Stämme in Apfelwein, dem wir folgende Zusätze machten: 1. 100 cm<sup>3</sup> Wein + 0,25 cm<sup>3</sup> Glycerin, eingestellt auf p<sub>H</sub> 8,0. 2. 100 cm<sup>3</sup> Wein + 0,25 cm<sup>3</sup> Glycerin + 1 g Glucose, eingestellt auf p<sub>H</sub> 6,0. 3. 100 cm<sup>3</sup> Wein + 0,25 cm<sup>3</sup> Glycerin + 1 g Glucose, p<sub>H</sub> unverändert = 3,6. Nach 24stündiger Bebrütung bei 25° C wurde im hängenden Tropfen mikroskopiert und folgendes festgestellt:

Stamm I bei p<sub>H</sub> 8,0 und 6,0 . . . feine, bewegliche Stäbchen,

Stamm II bei p<sub>H</sub> 8,0 und 6,0 . . . starke Stäbchen, beweglich.

Bei p<sub>H</sub> 3,6 zeigten Stamm I und II kein Wachstum, da die eingimpften Bazillen in dem sauren Milieu abstarben. Die Versuche mit unverändertem Apfelwein wurden mehrfach wiederholt. Wir fanden aber nie vegetative Zellen, auch Acrolein wurde nicht gebildet.

Die Abtötungstemperatur der Sporen beider Stämme liegt bei 100° C. Nach Behandlung in strömendem Dampf während 10 min keimten beide Stämme auf der Platte wieder aus. Bei einer Einwirkung von 15 min

wurden beide abgetötet. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37° C. In Apfelsaft (p<sub>H</sub> auf 6,0 eingestellt) übertragene Sporen beider Stämme erzeugten nach 12—16 Std an der Oberfläche kräftige Hautbildung. Bei 25° C tritt Hautbildung nach etwa 2 Tagen und bei 10° C nach 8—10 Tagen auf. Die Arten vermögen aber auch noch bei tieferer Temperatur zu wachsen. Solange die Haut dünn ist, liegen die Organismen einzeln oder hängen in kurzen Ketten aneinander. Mit fortschreitendem Alter kommt es, ähnlich wie beim *Bac. subtilis*, zur Zellkettenbildung und Verfilzung. Bereits nach 48 Std findet sich in den Zellen reichlich Volutin. Die Nährlösung, auch älterer Kulturen, bleibt blank<sup>1</sup>.

#### b) Versuche über Acroleinbildung.

Durch die beschriebenen Vorversuche wird deutlich, daß eine bakterielle Bildungsweise des Acroleins durch unsere *Bacillus*-Arten bei p<sub>H</sub> 6—8 möglich ist. Wie die Vermehrung in natürlichen Apfelsäften jedoch erfolgen soll, war uns zunächst unklar, zumal ihre Isolierung aus Mosten auf dem beschriebenen Nährboden ohne weiteres gelang, nicht hingegen die Weiterzüchtung in saurer Nährlösung. Es ist demnach anzunehmen, daß die Bacillen im sauren Medium nicht heimisch sind. Wir vermuten, daß es sich um Sporenbildner aus Erde handelt, da sie namentlich bei der Verarbeitung von Fallobst in großer Menge in dem Rohmaterial nachweisbar sind. Durch die Tatsache, daß es Sporenbildner sind, gelangten wir zu folgender Auffassung der bakteriellen Bildungsweise:

Die vegetativen Zellen sterben während der Gärung in dem sauren Milieu ab; die zu Boden sinkenden Sporen können nach beendeter Gärung in dem Hefegeläger wieder auskeimen, besonders dann, wenn durch lange Lagerung die Hefe zu autolysieren beginnt und dadurch einen günstigen Nährboden schafft.

Umfragen in der Praxis ergaben, daß häufig zum Abbrennen bestimmte Moste monatelang mit der Hefe bis zur weiteren Verarbeitung lagern.

Um unseren Vermutungen eine experimentelle Stütze zu geben, führten wir eine große Anzahl von Versuchen durch. Aus dem sehr umfangreichen Untersuchungsmaterial werden in den Tab. 1—4 nur die für das Gesamtproblem besonders charakteristischen Versuche mitgeteilt.

Für die einzelnen Ansätze verwendeten wir je 100 cm<sup>3</sup> Apfelsaft vom p<sub>H</sub> 3,6 aus unserer Institutsmosterei. Der Saft wurde 1/2 Std bei 0,5 Atü sterilisiert. Die für die einzelnen Versuche verwendeten Stämme wurden zur Kräftigung von der Schrägagar-Dauerkultur stets zunächst noch in Apfelsaft vom p<sub>H</sub> 6,0 abgeimpft und bei 25° C bebrütet. Nach erfolgter Vermehrung, die durch Hautbildung erkennbar ist, wurden wieder Schrägagarröhrchen angelegt und diese dann für die Versuchsansätze mit je 10 cm<sup>3</sup> sterilem Apfelsaft abgeschwemmt. Sollten nur Sporen zur Anwendung kommen, so wurde die Abschwemmung zur Abtötung der vegetativen Zellen nach Übergießen in ein steriles Reagensröhrchen 1/4 Std im Wasserbad bei 80° C gehalten.

<sup>1</sup> Eine eingehende bakteriologische Bearbeitung der Stämme I und II ist im Gange und wird zu einem späteren Zeitpunkt veröffentlicht werden.



Wir stellten den Apfelsaft nach der Beimpfung mit 1 cm<sup>3</sup> der oben angegebenen Abschwemmung mit vegetativen Zellen bzw. Sporen von Stamm I, Stamm II, oder einer Mischung derselben mit *Weinhefe Laureiro* zur Gärung an. Die Temperatur während der Gärung betrug in allen Fällen 25° C. Nach 5—6 Tagen war der Apfelsaft bereits endvergoren, blieb jedoch zur Sicherheit stets 10 Tage bei 25° C stehen. Danach wurden die Flaschen noch 20 Tage bei + 10° C gelagert. Die Kohlensäure wurde nicht herausgeschüttelt. Bei den Versuchen mit Glycerinzusatz (Merck, doppelt dest. reinst) wurden 0,25 cm<sup>3</sup> pro 100 cm<sup>3</sup> Apfelsaft zugefügt. Da sich bei unseren kleinen Ansätzen (100 cm<sup>3</sup>) nur wenig Hefe bilden konnte, vermehrten wir in einer Versuchsreihe den Bodensatz durch Zugabe von Geläger. Wir bereiteten zu diesem Zweck ein Hefeautolysat nach STOCKHAUSEN (1925), filtrierten das Autolysat ab, wuschen den Rückstand mehrmals mit Wasser aus und verwendeten ihn nach der Sterilisation als zusätzliches Geläger. Wir hofften, durch diese Vermehrung des Bodensatzes den Bacillen günstigere Lebensbedingungen in dem sauren Apfelwein zu verschaffen.

Tabelle 1. *Acroleinbildung in Apfelsaft der Institutsmosterei mit und ohne Zusatz von Hefegeläger und Glycerin nach 30 Tagen. Acroleinnachweis im Destillat mit NESSLERS Reagens. Acroleinmenge durch Anzahl Kreuze dargestellt.*

Nr.	Versuchsanordnung	Mikroskopischer Befund	Acroleingehalt
1	Stamm I, vegetativ + Hefegeläger . . . .	Zahlreiche Sporen, verein- zelt vegetative Zellen zum Teil in Ketten	++
2	Stamm II, vegetativ + Hefegeläger . . . .	Zahlreiche Sporen, verein- zelt vegetative Zellen zum Teil in Ketten	0
3	Stamm I, Sporen + Hefegeläger . . . .	Zahlreiche Sporen, verein- zelt vegetative Zellen zum Teil in Ketten	(+)
4	Stamm II, Sporen + Hefegeläger . . . .	Zahlreiche Sporen, verein- zelt vegetative Zellen zum Teil in Ketten	0
5	Stamm I, vegetativ . . .	Zahlreiche Sporen, verein- zelt vegetative Zellen	+++
6	Stamm II, vegetativ . .	Zahlreiche Sporen, ganz vereinzelt vegetative Zellen	+ / +++
7	Stamm I, Sporen . . . .	Zahlreiche Sporen, keine vegetativen Zellen	+++
8	Stamm II, Sporen . . . .	Zahlreiche Sporen, keine vegetativen Zellen	+
9	Stamm I, vegetativ + Glycerin . . . . .	Zahlreiche Sporen, keine vegetativen Zellen	(+)
10	Stamm II, vegetativ + Glycerin . . . . .	Zahlreiche Sporen, keine vegetativen Zellen	+

Die Proben wurden nach 30 Tagen mikroskopisch untersucht und dann abdestilliert. Als Vorlage dienten 25 cm<sup>3</sup> Meßkölbchen. Den Acroleingehalt bestimmten



wir mit NESSLERS Reagens und differenzierten die Mengen nach dem Grad der Schwarzfärbung des Niederschlages mit 0—5 Kreuzen. Im Zweifelsfalle bewerteten wir den Acroleingehalt mit einem Kreuz in Klammern. Die mikroskopische Durchmusterung der einzelnen Proben war sehr zeitraubend und wenig befriedigend. Trotzdem wurde nicht darauf verzichtet, da uns das Aussehen der beiden *Bacillus*-Arten in dem ihnen nicht zusagenden sauren Milieu interessierte. Sie waren gegenüber den im alkalischen Apfelsaft gezüchteten wesentlich schlanker und vielfach auch kürzer. Eine Auswahl der Versuchsergebnisse veranschaulicht Tab. 1.

Wie die Versuche 1—4 zeigen, bewirkte die künstliche Vermehrung des Bodensatzes keine Steigerung der Acroleinbildung. Die Höchstmenge wurde vielmehr bei den Versuchen 5—8 ohne Zusatz von Hefeläger gefunden. Auffällig ist, daß auch zusätzlich vermehrter Glyceringehalt (Vers. 9 u. 10) ohne nennenswerten Einfluß blieb. Wir haben durch diese Versuche den Beweis erbracht, daß, von zwei Ausnahmen abgesehen, mit unseren Stämmen Acroleinbildung auch im natürlichen Apfelsaft zu erreichen ist.

In weiteren Versuchsreihen wurde die Acroleinbildung in Apfelmaisichen studiert. 100 g gemahlene Äpfel wurden in 250 cm<sup>3</sup>-Kolben eingewogen und 1½ Std bei 0,5 Atü, genau wie der Apfelsaft, sterilisiert. Die Resultate einer dieser Reihen sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. *Acroleinbildung in Apfelmaisichen nach 30 Tagen (NESSLERS Reagens).*

Nr.	Versuchsanordnung	Mikroskopischer Befund	Acroleingehalt
1	Stamm I, vegetativ . . .	Zahlreiche Sporen	+
2	Stamm I, Sporen. . . .	Zahlreiche Sporen, vereinzelt verkümmerte Zellen	+++
3	Stamm II, vegetativ . . .	Zahlreiche Sporen, vereinzelt verkümmerte Zellen	+++
4	Stamm II, Sporen . . . .	Zahlreiche Sporen, vereinzelt verkümmerte Zellen	+++
5	Stamm I, vegetativ (ohne Vergärung) . . .	Zahlreiche Sporen, vereinzelt vegetative Zellen	0
6	Stamm II, vegetativ (ohne Vergärung) . . .	Zahlreiche Sporen, vereinzelt vegetative Zellen zum Teil in Ketten	++++
7	Stamm I, Sporen (ohne Vergärung) . . .	Zahlreiche Sporen, vereinzelt vegetative Zellen.	(+)
8	Stamm II, Sporen (ohne Vergärung) . . .	Zahlreiche Sporen, vereinzelt vegetative Zellen zum Teil in Ketten	++++
9	Stamm II (pH = 6,0, ohne Vergärung) . . .	Sporen, verkümmerte Zellen	++

Ganz allgemein geht aus diesen Versuchen hervor, daß Maisichen anfälliger für die Infektion sind als Moste. Das liegt nach unseren Beobachtungen vor allem daran, daß die Bacillen in dem Apfelbrei nicht zu

Boden sinken, sondern sich an der Oberfläche gut vermehren können. Außerdem dauert die Vergärung durch die Hefe bei Maischen länger als bei den Mosten, so daß bis zur Erreichung des Endvergärungsgrades den Bacillen auch der Zucker länger als Nahrungsquelle zur Verfügung steht. Bei Beimpfung mit Sporen vom Stamm I wurde eine bedeutend größere Acroleinmenge gefunden als durch Zugabe von vegetativen Zellen, während beim Stamm II auch die vegetativen die gleiche Acroleinmenge produzierten. Auch in weiteren Versuchen zeigte sich, daß Stamm I zwar wuchsfreudiger als Stamm II ist, jedoch stets weniger Acrolein liefert. Auffallend ist, daß Stamm II in der Maische ohne Hefe-Gärung und auch ohne Glycerinzusatz eine erhebliche Acroleinmenge bildete und zwar sowohl durch Beimpfung mit vegetativen Zellen als auch mit Sporen, während Stamm I als der schwächere Acroleinbildner nur durch Verimpfung von Sporen Acrolein in Spuren erzeugen konnte. Es lag daher die Vermutung nahe, daß die Bacillen das Acrolein nicht nur aus dem Glycerin, sondern auch aus den sonstigen Nährstoffen (Eiweiß und Zucker) bilden können. Orientierende Versuche ergaben, daß sich die Organismen in Glucose, Pepton und Caseinlösungen zwar gut vermehrten, aber kein Acrolein bildeten, was allerdings kein Beweis ist, daß bei aerobem Wachstum unter dem Einfluß von Sauerstoff und uns noch unbekannten Stoffen des natürlichen Substrats ein Angriff auf die Glucose unmöglich wäre. Man könnte daran denken, daß in die oxydativen Vorgänge Decarboxylierungen eingreifen und so allmählich die Glucose zum Glycerin abgebaut wird. Es wäre auch möglich, daß unsere Organismen befähigt sind, Glucose durch einen anoxybiontischen Spaltungsvorgang über 2 Triosen in Glycerin zu verwandeln (BERNHAEUER, 1932).

Die große Anzahl von Reihenversuchen die wir durchführen mußten, um die verschiedensten Einflüsse wie Temperatur, Anwendung von vegetativen Zellen oder Sporen, Verhalten der Bacillen in Mosten und Maischen, Wachstumsbedingungen und Acroleinbildungsvermögen in eiweiß- und glycerinhaltigem Ausgangsmaterial zu prüfen, zwangen uns, mit kleinen Ansätzen zu arbeiten. Die aus 100 cm<sup>3</sup> (bei Maischen 100 g) gewonnene Alkoholmenge betrug demzufolge nur etwa 5—6 g. Um diese quantitativ zu gewinnen, wurden bei den in den Tab. 1 und 2 wiedergegebenen Versuchen 25 cm<sup>3</sup> und den jetzt folgenden 50 cm<sup>3</sup> abdestilliert. Bei geringen Acroleinmengen, die wir mit einem Kreuz oder mit einem Kreuz in Klammern angaben, machte die Differenzierung jedoch oft Schwierigkeiten. Es fiel uns auch auf, daß bei den Versuchen ohne Vergärung NESSLERS Reagens eine große Acroleinmenge anzeigte. Die Einführung der von uns modifizierten Titrationsmethode nach TIEMANN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Beschreibung der modifizierten Methode ist zusammen mit weiteren rein chemischen Versuchen, als 3. Mitteilung in der Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung **92**, 96 (1951) erschienen.

entthob uns der geschilderten Schwierigkeiten. In den Tab. 3 und 4 haben wir die Ergebnisse beider Methoden gegenübergestellt.

Tabelle 3. *Acroleinbildung in laboratoriumsmäßig gewonnenem Apfelsaft (ungeklärt und geklärt) mit und ohne Zusatz (Glycerin, Glucose).*

Nr.	Versuchsanordnung	Destillation nach Lagerung von		
		10 Tagen	56 Tagen	
		Bestimmung durch		
		Titration <sup>1</sup>	Titration <sup>1</sup>	NESSLERS Reagens
1	Stamm I, vegetativ. . .	14	154	+++++
2	Stamm II, vegetativ. . .	3	56	+
3	Stamm I + Glycerin vegetativ. . . . .	6	12	(+)
4	Stamm II + Glycerin vegetativ. . . . .	6	14	0
5	Stamm I + Glucose vegetativ. . . . .	6	28	(+)
6	Stamm II + Glucose vegetativ. . . . .	14	14	(+)
Rohsaft mit Gelatine geklärt				
7	Stamm I, vegetativ. . .	0	14	+
8	Stamm II, vegetativ. . .	0	98	++
9	Stamm I + Glycerin vegetativ. . . . .	0	28	+
10	Stamm II + Glycerin vegetativ. . . . .	0	56	+ / ++
11	Stamm I + Glucose vegetativ. . . . .	0	84	+ / ++
12	Stamm II + Glucose vegetativ. . . . .	0	84	++ / +++

<sup>1</sup> mg pro Liter Most

Während wir zu den in Tab. 1 wiedergegebenen Versuchen Apfelsaft aus der Institutsmosterei verwendeten, stellten wir ihn jetzt durch Auspressen von Äpfeln selbst her. Anlaß zu der Wahl dieses Ausgangsmaterials gab uns der Hinweis WARCOLLIERS (1934), daß durch eine gute Klärung des Apfelsaftes das Aufkommen der Infektion verhindert oder in engen Grenzen gehalten werden könnte. Wir führten dies für einige Versuchsreihen, wie in der Praxis üblich, mit Gelatine durch. Aus allen Ansätzen wurde nach einer Lagerzeit von 10 Tagen 50 cm<sup>3</sup> vergorener Saft steril entnommen und auf Acrolein untersucht. Hierbei zeigten die unbehandelten Ansätze durchweg Acrolein in wechselnden Mengen, während die geklärten acroleinfrei waren. Nach einer weiteren Lagerzeit von 46 Tagen stieg die Acroleinmenge bei den unbehandelten Rohsäften weiter an, aber auch die mit Gelatine behandelten zeigten jetzt Acrolein in der gleichen Größenordnung.

Demnach scheint es möglich zu sein, durch Klärung, rasche Vergärung und Vermeidung einer Lagerung über der Hefe die Bildung von Acrolein zu verhindern, oder in mäßigen Grenzen zu halten.

Tabelle 4. *Acroleinbildung in Apfelmaischen, nach 30 Tagen, qualitative und quantitative Bestimmung.*

Nr.	Versuchsanordnung	Mikroskopischer Befund	Acroleingehalt	
			Titration <sup>1</sup>	NESSLERS Reagens
1	Stamm I . . . .	Vereinzelt vegetative Zellen	140	++
2	Stamm II . . . .	Vereinzelt vegetative Zellen	112	+ / ++
3	Stamm I (5 Tage Vorbebrütung) .	Wenig vegetative Zellen, wenig Sporen	112	+ / ++
4	Stamm II (5 Tage Vorbebrütung)	Vereinzelt vegetative Zellen	126	+ / ++
5	Stamm I + II (5 Tage Vorbebrütung) . . . . .	Vereinzelt vegetative Zellen, wenig Sporen	126	+ / ++
6	Stamm I (ohne Vergärung) . . .	Zahlreiche vegetative Zellen, zahlreiche Sporen	28	+++ / ++++
7	Stamm II (ohne Vergärung) . . .	Zahlreiche vegetative Zellen, zahlreiche Sporen	28	++
8	Stamm I + Glucose (ohne Vergärung)	Zahlreiche vegetative Zellen zum Teil in Ketten, vereinzelt Sporen	28	+++
9	Stamm II + Glucose (ohne Vergärung) . . .	Zahlreiche vegetative Zellen zum Teil in Ketten, vereinzelt Sporen	56	++++
10	Stamm I (ohne Vergärung pH 6,0)	Zahlreiche vegetative Zellen, zahlreiche Sporen	70	++++
11	Stamm II (ohne Vergärung pH 6,0)	Zahlreiche vegetative Zellen, zahlreiche Sporen	98	+++

<sup>1</sup> mg/kg Maische.

Tab. 4 stellt teilweise eine Wiederholung der in Tab. 2 wiedergegebenen Versuche dar, jedoch mit dem Unterschied, daß jetzt das Acrolein qualitativ und quantitativ bestimmt wurde. Alle Ansätze wurden nur mit Sporen beimpft. Bemerkenswert ist, daß eine Vorbebrütung auf die



Acroleinbildung ohne nennenswerten Einfluß blieb. Wir schalteten diese ein, weil wir bei den Maischeversuchen ein gutes Oberflächenwachstum beobachteten. Auch war, wie die Versuche 5—9 der Tab. 2 zeigen, Acrolein ohne Vergärung entstanden. Durch die Vorbebrütung sollte der Einfluß einer schleppenden Gärung nachgeahmt werden. Die entsprechenden, mit den Sporen beimpften Ansätze wurden erst nach 5tägiger Bebrütung bei 25° C mit Hefe angestellt. Bei den Versuchen ohne Vergärung erbrachte die zusätzliche Zuckergabe bei Stamm II eine Erhöhung der Acroleinmenge auf das Doppelte. Bei den Versuchen der Nr. 10 und 11 wird deutlich, daß die Bacillen ein neutrales Medium bevorzugen.

Ein Orientierungs-Versuch sollte den Einfluß des Kaliumpyrosulfits klären, das als Desinfektionsmittel in der Brennerei-Praxis Verwendung findet. Es wird auch bis zu einer Höchstmenge von 200 mg SO<sub>2</sub>/Liter als Vorbeugungsmittel gegen unerwünschten Bakterienbefall empfohlen und den Säften direkt zugesetzt. Der Eintritt der Gärung wird hierdurch allerdings um etwa 4 Tage verzögert. Eine Beeinträchtigung des Acroleinbildungsvermögens unserer Stämme I und II trat bei Verwendung in oben angegebener Konzentration jedoch nicht ein.

## II. Auswertung unserer quantitativen Acroleinbestimmungen.

Wie aus den Tab. 3 und 4 ersichtlich, schwanken die mit unseren Rein- kulturen erzeugten Acroleinmengen zwischen 12 und 154 mg/Liter. Zahlreiche Untersuchungen uns eingesandter Moste ergaben Gehalte von 28—168 mg/Liter. WARCOLLIER (1932) gibt für 2 Apfelweine 50 und 100 mg, für 1 Birnenwein 120 mg/Liter an. Unsere Werte liegen also in der gleichen Größenordnung.

Uns zur Begutachtung eingesandte Branntweinproben enthielten zwischen 1,12 und 2,60 g/Liter. WARCOLLIER gibt als Höchstmenge 1,03 g/Liter an. Um festzustellen, ob der bei unseren Versuchen sehr verdünnt gewonnene Alkohol bei Konzentration auf Trinkstärke (40 Vol%) die Werte der Praxis erreicht, verfahren wir wie folgt: 63 Destillate von Mostversuchen zu je 30 cm<sup>3</sup> wurden vereinigt und durch zweimalige Destillation auf ein Volumen von 50 cm<sup>3</sup> konzentriert. Es resultierte ein Branntwein von 38,3 Vol%. Die titrimetrische Bestimmung ergab einen Acroleingehalt von 1,45 g/Liter auf 40 Vol% igen Alkohol berechnet. Von den Maischeversuchen wurden 23 Proben zu je 25 cm<sup>3</sup> auf 33,6 Vol% Alkohol konzentriert. Dieser enthielt 1,65 g/Liter, wieder auf 40 Vol% igen Alkohol berechnet.

Mit diesen Werten kommen wir den durchschnittlichen, von uns festgestellten Acroleinmengen der Praxis nahe und liegen oberhalb der von WARCOLLIER mitgeteilten Daten.

### III. Zusammenfassung.

Es gelang, aus Mosten der Praxis 2 *Bacillus*-Arten zu isolieren, die unter natürlichen Bedingungen ( $p_H$  3—4) Acrolein zu erzeugen vermögen.

Die Versuche wurden sowohl mit Apfelsaft als auch mit Apfelmaische durchgeführt. Bei aerobem Wachstum wurde Acrolein auch ohne Gärung gebildet.

Neben dem qualitativen Nachweis des Acroleins mit NESSLERS Reagens wurde die TIEMANNSche Methode zur Aldehydbestimmung sinngemäß zur quantitativen Acroleinbestimmung angewandt. Die durch die isolierten Organismen erzeugten Acroleinmengen liegen innerhalb der in der Praxis vorkommenden Grenzwerte.

Eine Bekämpfung der Infektion im praktischen Betrieb ist beschränkt möglich. Sofortiges Abziehen der vergorenen Säfte von der Hefe kann die Acroleinbildung in gewissen Grenzen halten. Maischen müssen nach beendeter Gärung sofort weiterverarbeitet werden.

Die Arbeiten werden fortgesetzt.

### Literatur.

BERNHAEUER, K.: „Die oxydativen Gärungen“ S. 115ff., Berlin 1932. — HOLZ, G., u. G. WILHARM: Z. f. Lebensmittel-Untersuchung u. Forschung **91**, 255 (1950). — HUMPHREYS, F. B.: J. inf. Dis. **35**, 282 (1924). — LEHMANN-NEUMANN: Bakteriologische Diagnostik, 7. Aufl. II. Bd., München 1927. — REYNOLDS, H.: Iowa State College J. Sci. **13**, 275 (1939). — STOCKHAUSEN, F.: Wschr. f. Brauerei **42**, Nr. 3—8 (1925). — VOISENET, E.: Ann. Past. **32**, 476 (1918). — WARCOLLIER, G., u. Mitarb.: C. r. Acad. Sci. Paris **194**, 1394 (1932); **198**, 1546 (1934).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster i. W.)

## **Nitrosomonas oligocarbogenes, ein obligat autotrophes Nitritbakterium.**

Von

**H. BÖMEKE.**

Mit 7 Tabellen und 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Februar 1950.)

Die Nitritbakterien vermögen bekanntlich wie die grünen Pflanzen autotroph zu leben. Die zur Reduktion des  $\text{CO}_2$  erforderliche Energie schöpfen sie aus der Oxydation von  $\text{NH}_4^+$  zu  $\text{NO}_2^-$ . Bereits 1939 wies ich darauf hin, daß das Verhältnis des dabei oxydierten Stickstoffs zum reduzierten Kohlenstoff von den verschiedenen Autoren verschieden hoch angegeben wird. WINOGRADSKY (1906) fand bekanntlich ein N/C-Verhältnis von 35/1; MEYERHOF (1917), der mit dem Bakterienstamm von WINOGRADSKY arbeitete, bestätigte die Angaben des russischen Forschers. ENGEL (1929) analysierte den von HEUBÜLT (1929) in Reinkultur gebrachten *Nitrosomonas*-Stamm und fand rund die Hälfte an Kohlenstoff, d. h. auf 70—80 Gewichtsteile oxydierten Stickstoffs entfiel erst 1 Teil reduzierten Kohlenstoffs. NELSON (1931) dagegen fand schon auf 14,3 Teile oxydierten Stickstoffs 1 Teil reduzierten Kohlenstoff. HES (1937) prüfte den von BOLTJES (1935) isolierten Nitritbildner und bestätigte wiederum die Angaben WINOGRADSKYS und MEYERHOFs, indem er auch annähernd 35/1 fand.

Die Angaben schwanken also beträchtlich. Was ist nun von diesen Werten zu halten? Sind etwa methodische Fehler bei der Anzucht der Bakterien oder während der C-Analyse unterlaufen? Hat NELSON mit unreinen Kulturen gearbeitet, weil er mehr Kohlenstoff fand? Oder sind Bakterien untersucht worden, die auf der Grundlage gleicher Stickstoffmengen verschiedene Mengen Kohlendioxyd reduzieren? Alle diese Fragen lassen sich theoretisch schwer beantworten; so glaubte z. B. MOTHES (1930), WINOGRADSKY könnte vielleicht, als er seine C-Bestimmungen ausführte, den Nitratbildner noch nicht völlig vom Nitritbildner getrennt haben; dadurch hätte er vielleicht zuviel Kohlenstoff in seinen Analysen gefunden. Doch dürfte sich dann, wie ENGEL (1931) ganz richtig bemerkt, das N/C-Verhältnis nicht so sehr verschieben, weil das N/C-Verhältnis des Nitratbildners nach MEYERHOF nur 135/1 ist. Auf Grund meiner Untersuchungen von 1939 spricht ENGEL (1941) die Vermutung aus, durch dissimilatorische Vorgänge in der Zelle könnten vielleicht gewisse Mengen Kohlenstoff durch  $\text{CO}_2$ -Abgabe verlorengehen. In der Tat fanden MEYERHOF und auch HES in jungen Kulturen bei der Oxydation gleicher Mengen Stickstoff mehr Kohlenstoff als in alten. Doch sind die C-Verluste so gering, daß sie die beobachteten Unstimmig-





gefüllten Verbrennungskolben auf einem erhitzten Sandbad unter gleichzeitigem Durchsaugen eines starken Luftstromes eingeengt. Dadurch wurde ein schnelles Eindampfen der Flüssigkeit bei einer Temperatur unterhalb 100 ° C erreicht. Für die Einengung von 100 cm<sup>3</sup> auf 40 cm<sup>3</sup> wurde rund 1 Std benötigt.

Die quantitative C-Bestimmung erfolgte im Prinzip nach dem bekannten MESSINGER-Verfahren, das auch in der modifizierten Form von ENGEL (1929) benutzt wurde. Da ENGEL (1941) eine eingehende Beschreibung gibt, seien hier im wesentlichen die Abänderungen genannt.

Um bei jeder C-Analyse möglichst gleiche Mengen Luft durch die Apparatur (Abb. 1) saugen zu können, wurde ein Strömungsmanometer (A) vor die MARIOTTEsche Flasche (B) geschaltet, die zu ein Drittel mit konz. KOH gefüllt war. Sie schützte bei plötzlich auftretendem starken Sog das Strömungsmanometer vor Überlauf und absorbierte dann automatisch zusätzlich Kohlensäure. Um den Unterdruck in der Apparatur nicht zu groß werden zu lassen, besaß nur die zweite der beiden Waschflaschen (C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub>) eine Glasfilterplatte Nr. „G 1“ der Firma Schott, Jena. Sie enthielten zur CO<sub>2</sub>-Absorption konz. KOH, weil der Aufsatz (D<sub>1</sub>) des Verbrennungskolbens (D<sub>2</sub>) allein für die restlose Absorption der CO<sub>2</sub> nicht genügte. Zur Überwachung der Temperatur, die unter 180° C bleiben mußte, befand sich im Sandbad (E) ein Thermometer (F). Das Verbrennungsrohr mit dem Platinstern (G<sub>1</sub>) und dem mit PbO<sub>2</sub> beschickten Porzellanschiffchen (G<sub>2</sub>) ruhte in einem Verbrennungsöfchen (in der Abbildung nicht gezeichnet), das durch einen Teclu-Breitbrenner erhitzt wurde. Der Dreivegehahn (H) hatte den Zweck, bei Beendigung der Analyse den Unterdruck in der Apparatur auszugleichen. Die Absorptionsgefäße (I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub>) mußten ohne Glasfilter gebaut werden, da sonst der Unterdruck in den Absorptionsgefäßen so groß wurde, daß Lauge und Säure in unkontrollierbarer Weise aus den Bürettenspitzen gesaugt wurden. Es wurden je 5 cm<sup>3</sup>  $\frac{n}{100}$  KOH vorgelegt und mit  $\frac{n}{100}$  HCl zurücktitriert, der 12,5 g BaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O/Liter beigelegt waren. Aus dem Verbrauch errechnete sich die durch die Bakterienverbrennung entstandene CO<sub>2</sub>. Der Quetschhahn (K) diente zur Einstellung der gewünschten Strömungsgeschwindigkeit. Als Ansaugflasche (Aspirator) wurden zwei 50 Litergefäße benutzt, die mittels Wasserstrahlpumpe evakuiert wurden und untereinander und mit einem Hg-Manometer (L) zur Kontrolle des Unterdrucks verbunden waren.

Ein PELIGOT-Gefäß für die Absorption nitroser Gase war nicht erforderlich, da durch das vorherige Eindampfen der angesäuerten Kulturlösung bei starkem Luftstrom sämtliche Stickoxyde ausgetrieben wurden. Das PbO<sub>2</sub> im Verbrennungsrohr mußte bereits vor dem eigentlichen Verbrennungsprozeß erhitzt werden, da andernfalls CO<sub>2</sub> von PbO<sub>2</sub>, das außerdem Spuren von C enthält, gebunden wird.

In den Tabellen ist unter oxydiertem Stickstoff diejenige Menge zu verstehen, die aus dem NH<sub>4</sub>-Salz in der Nährlösung errechnet wurde. Während der Sterilisation und Nitrifikation gingen 10—20 % Stickstoff je nach pH-Wert und Nitrifikationsverlauf verloren. Dieser N-Verlust ist nicht berücksichtigt worden. Das Alter der Kultur wurde vom Impftage an gerechnet. Der in den Tabellen enthaltene Mittelwert des N/C-Verhältnisses ist nicht durch Mittelung der N/C-Verhältnisse der einzelnen Kolben (Spalte 4) errechnet worden, sondern aus der Summe von Spalte 2 und 3 unter Subtraktion der jeweiligen Blindwerte für jede Gruppe.

## II. Versuche.

### 1. N/C-Verhältnis bei Stamm 44.

Der *Nitrosomonas*stamm 44 war seinerzeit von ENGEL und SKALLAU (1941) mit der von ihnen gemeinsam ausgearbeiteten Verdünnungsmethode aus Berliner Gartenerde isoliert worden. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: 2,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 6,0 g  $\text{CaCO}_3$  im Liter Wasser;  $\text{pH} = 7,3-7,4$ .

Der erste Versuch umfaßte 13 Kolben mit je 150 cm<sup>3</sup> Nährlösung. Die Kolben standen bei 36° C im Brutschrank. Nachdem die Kulturen etwa 2—3 Wochen  $\text{NH}_3$ -frei geworden waren, begann ich mit der C-Bestimmung. Zunächst analysierte ich nur den Inhalt von 5 Kolben. Wie die Tab. 1 angibt, erhielt ich bei einer etwa 42 Tage alten Kultur als Mittelwert ein N/C-Verhältnis von 79,5/1.

Ein Vierteljahr später untersuchte ich von der gleichen Serie zwei Kulturen und fand ein etwas ungünstigeres N/C-Verhältnis, nämlich 84,5/1. Das Alter dieser Kulturen betrug 138,5 Tage im Mittel. Offenbar war ein kleiner Teil des Kohlenstoffs durch Restatmung verlorengegangen.

Die restlichen 6 Kulturen wurden wiederum ein Vierteljahr später analysiert. Die Mittelwerte waren nicht wesentlich verschieden von den C-Werten vor einem Vierteljahr. Die kleine Abweichung kann man als zufällig ansehen, dürfte aber auch als eine Andeutung für das Vorhandensein eines dissimilatorischen Stoffwechsels betrachtet werden können. Andererseits erhalten durch die Ergebnisse dieses Versuchs die Angaben ENGELS, der ein N/C-Verhältnis von 70—80/1 beim Nitritbildner fand, eine Bestätigung.

### 2. N/C-Verhältnis bei Stamm 32.

Diesen Nitritbildnerstamm isolierte ich nach dem von ENGEL und SKALLAU angegebenen Verdünnungsverfahren aus einer Komposterde des Botanischen Gartens in Münster. 4 Kolben mit je 150 cm<sup>3</sup> Nährlösung von der gleichen Zusammensetzung wie oben, beimpfte ich mit einer Platinöse von einer gut nitrifizierenden Kultur und züchtete die Bakterien bei einer Temperatur von ebenfalls 36° C. Etwa ein Vierteljahr nach der Beimpfung machte ich die Analysen mit derselben C-Bestimmungsapparatur und benutzte die gleichen Chemikalien. Alle äußeren Bedingungen waren somit gleich, nur der Bakterienstamm war ein anderer.

Das Analysenergebnis war, wie Tab. I zeigt, ebenfalls ein anderes. Da der Versuch nur aus 4 Kolben bestand, konnte der Einfluß des Alterns bei diesem Stamm nicht geprüft werden. Auffallend günstig fiel das N/C-Verhältnis aus. Verglichen mit dem vorigen Nitritbildnerstamm 44, war die in den Bakterienzellen festgelegte Kohlenstoffmenge fast doppelt so groß.

Mit dem N/C-Verhältnis von 44,3/1 nähert sich der Stamm 32 den Stämmen, mit denen WINOGRADSKY, MEYERHOF und HES gearbeitet haben, die 35/1 fanden. Daß meine Werte etwas ungünstiger ausgefallen sind, dürfte daran liegen, daß ich nicht die N-Verluste, die durch die

Sterilisation der Nährlösung und während der Nitrifikation eintreten, berücksichtigt habe. Ziehen wir etwa 20% der N-Verluste ab, so ergibt sich rund 35/1. Es könnte somit der Stamm 32 identisch mit den Stämmen sein, mit welchen die oben genannten Forscher ihre Analysen durchgeführt haben.

Tabelle 1.

*Orientierungsversuch über das N/C-Verhältnis der Nitritbildnerstämme 44 und 32 bei 36° C.*

Kolben Nr.	Oxydierter N in mg	Gefundener C in mg	N/C- Verhältnis	Alter der Kultur (Tage)
Stamm 44.				
1	63,6	0,790	80,5	41
2	63,6	0,784	81,3	41
3	63,6	0,796	80,0	42
4	63,6	0,814	78,4	42
5	63,6	0,820	77,6	43
Sa.	318,0	4,004		
Mittel- wert			79,5	41,8
6	63,6	0,748	85,2	137
7	63,6	0,758	84,0	140
Sa.	127,2	1,506		
Mittel- wert			84,5	138,5
8	63,6	0,758	85,2	212
9	63,6	0,818	78,0	213
10	63,6	0,776	80,7	213
11	63,6	0,626	101,5	214
12	63,6	0,772	82,5	226
13	63,6	0,716	89,0	231
Sa.	381,6	4,466		
Mittel- wert			85,4	218,0
Stamm 32.				
1	63,60	1,350	47,2	88
2	63,60	1,524	41,7	90
3	63,60	1,452	43,8	111
4	57,24	1,286	44,5	111
Sa.	248,04	5,612		
Mittel- wert			44,3	100

### 3. Vergleichende Untersuchungen an Stamm 44 und 32 und ihr N/C-Verhältnis.

Da mir in dem unterschiedlichen  $\text{CO}_2$ -Reduktionsvermögen von Stamm 44 und 32 ein erster Hinweis zur Klärung der sich widersprechenden Literaturangaben zu liegen schien, entschloß ich mich, meine Bakterienstämme auf breiter Basis zu untersuchen. Ich setzte mehrere Doppelversuche an, die in methodischer Hinsicht den oben geschilderten weitgehend glichen. Für die einzelnen Doppelversuche wurde die Nährlösung gemeinsam für beide Bakterienstämme in einer großen Flasche angesetzt, gleichzeitig unter völlig gleichen Bedingungen in  $750 \text{ cm}^3$  fassenden ERLNMEYER-Kolben mit  $150 \text{ cm}^3$  Kulturlösung sterilisiert und einige Tage später die eine Hälfte der für den Doppelversuch angesetzten Kulturen mit dem Stamm 32, der andere mit dem Stamm 44 beimpft. Sämtliche Kulturen eines Versuches standen im gleichen Brutschrank und nitrifizierten somit bei gleicher Temperatur. Es war also für vollkommene Gleichheit der Kulturbedingungen gesorgt. Der einzige Unterschied bestand nur in der Verschiedenheit der Bakterienstämme.

a) Für den ersten Versuch wählte ich 8 Kolben und beimpfte 4 mit dem Stamm 44 und 4 mit dem Stamm 32. Die Kulturen nitrifizierten bei einer Temperatur von  $36^\circ \text{C}$  sehr schnell. Einen Monat nach der Beimpfung der Nährlösung konnte ich bereits mit der C-Bestimmung beginnen.

Wie Tab. 2 angibt, wurde das vorher gefundene Ergebnis bestätigt. Beim Stamm 32 fand ich wiederum ungefähr die doppelte Menge Kohlenstoff. Merkwürdig ist, daß sich trotz der verschiedenen absoluten Werte die relativen so gut wie gar nicht verschoben haben. Bilden wir aus den Mittelwerten der N/C-Verhältnisse der beiden Stämme das Verhältnis Stamm 44/Stamm 32, so ergibt sich aus den früheren Versuchen  $84,5/44,3 = 1,90$ , in diesem  $67,3/34,8 = 1,94$ .

Tabelle 2. Das N/C-Verhältnis der beiden Nitritbildnerstämme 44 und 32  
bei ungehemmter Nitrifikation.

Kolben Nr.	Oxy- dierter N in mg	Gefun- dener C in mg	N/C- Verhält- nis	Alter der Kultur (Tage)	Kolben Nr.	Oxy- dierter N in mg	Gefun- dener C in mg	N/C- Verhält- nis	Alter der Kultur (Tage)
Stamm 44.					Stamm 32.				
1	63,6	0,918	69,3	29	1	63,6	1,914	33,0	33
2	63,6	0,912	69,5	29	2	63,6	1,932	32,8	37
3	63,6	0,972	65,2	33	3	63,6	1,710	35,7	40
4	63,6	0,954	66,5	33	4	63,6	1,764	35,8	40
Sa.	254,4	3,756			Sa.	254,4	7,320		
Mittel- wert			67,8	31	Mittel- wert			34,8	37,5

Das für beide Stämme günstigere N/C-Verhältnis in diesem Versuch könnte dadurch entstanden sein, daß erstens die Kulturen noch sehr jung waren und durch den dissimilatorischen Stoffwechsel kaum



nennenswerte C-Mengen verloren hatten und zweitens die N-Verluste infolge der schnellen Nitrifikation während der Anzucht gering waren, wodurch die C-Werte höher ausfielen. Welcher Fall vorgelegen hat, ist nicht zu entscheiden, vermutlich sind noch mehr Faktoren für das ungewöhnlich günstige N/C-Verhältnis verantwortlich zu machen.

Tabelle 3. *Das N/C-Verhältnis der Nitritbildnerstämme 44 und 32 bei 35° C und etwas gestörter Nitrifikation.*

Kolben Nr.	Oxydierter N in mg	Gefundener C in mg	N/C-Verhältnis	Alter der Kulturen (Tage)
Stamm 44.				
1	127,2	1,425	89,3	70
2	127,2	1,745	72,7	70
3	127,2	1,425	89,3	70
4	127,2	1,557	81,7	71
5	127,2	1,407	90,4	96
6	63,6	0,747	85,2	96
7	63,6	0,781	81,4	97
8	127,2	1,725	73,8	124
9	127,2	1,851	68,8	124
10	63,6	0,775	82,1	124
11	127,2	1,623	78,4	125
12	63,6	0,747	85,2	125
13	127,2	1,605	79,4	125
14	127,2	1,721	74,0	126
Sa.	1526,4	19,134		
Mittelwert			79,7	103
Stamm 32.				
1	127,2	2,709	46,8	72
2	89,5	2,008	44,4	97
3	63,6	1,333	47,7	98
4	63,6	1,435	44,4	128
5	63,6	1,495	42,5	129
6	63,6	1,525	41,7	130
Sa.	471,1	10,505		
Mittelwert			44,8	109

b) Obiger Versuch wurde mit 50 Kulturen wiederholt. Die eine Hälfte der Kolben wurde mit dem Stamm 32, die andere mit 44 beimpft und die Brutschranktemperatur um 1° C gesenkt. Die Beimpfung erfolgte am 4. und 5. September 1941. Am 23. Oktober 1941 wurden sämtliche Kulturen auf Nitritbildung und Ammoniakschwund geprüft. Das Analysenergebnis fiel aus unerklärlichen Gründen sehr ungünstig aus.

Die Kulturen hatten zwar Nitrit gebildet, aber nur wenige waren ausnitrifiziert. Die Kulturen, die bei der vierten Prüfung am 7. Januar 1942 nicht zu Ende nitrifiziert hatten, ergaben viel zu niedrige C-Werte. Nur 32 Kulturen waren nitritfrei und nur deren Analysenwerte sind in der Tab. 3 niedergelegt worden. Bei den Kulturen mit 127,2 mg N handelt es sich um 2 Kolben mit je 150 cm<sup>3</sup> Kulturlösung.

Aus dem vorliegenden Versuchsergebnis kann man wiederum auf das Vorhandensein eines unterschiedlichen N/C-Verhältnisses zwischen den beiden Stämmen 32 und 44 schließen. Das Verhältnis der Mittelwerte beider Stämme ist ungefähr gleich geblieben, nämlich  $79,7/44,8 = 1,78$ .

Tabelle 4. *Das N/C-Verhältnis der Nitritbildnerstämme 44 und 32 bei stark gehemmter Nitrifikation.*

Kolben Nr.	Oxydierter N in mg	Gefundener C in mg	N/C-Verhältnis	Alter der Kultur (Tage)
Stamm 44.				
1	63,6	0,807	78,7	101
2	63,6	0,897	70,9	102
3	63,6	0,843	75,7	102
4	63,6	0,765	83,2	103
5	127,2	1,188	107,1	104
6	127,2	1,290	98,5	106
7	127,2	1,284	99,0	107
8	127,2	1,236	103,0	108
Sa.	763,2	8,310		
Mittelwert			91,7	104,1
Stamm 32.				
1	63,6	1,311	48,5	68
2	63,6	1,329	48,0	69
3	63,6	1,413	45,0	69
4	63,6	1,245	51,1	70
5	127,2	2,208	57,7	77
6	63,6	1,215	52,4	79
7	127,2	2,076	61,3	79
Sa.	572,4	10,797		
Mittelwert			52,9	73

c) Am 25. Februar 1942 wiederholte ich nochmals den obigen Versuch mit 24 Kolben zu je 150 cm<sup>3</sup> der üblichen Nährlösung und beimpfte sie zur Hälfte mit dem Stamm 32, zur Hälfte mit dem Stamm 44. Die Nitrifikation verlief wieder schlecht.

Das Analysenergebnis bringt die Tab. 4. Ein auffallend ungünstiges N/C-Verhältnis finden wir sowohl beim Stamm 44 als auch beim Stamm 32.

Nach meiner Ansicht muß dieses ungünstige N/C-Verhältnis in der Hauptsache auf die langsame Nitrifikation zurückgeführt werden. Das Verhältnis der Mittelwerte ist ähnlich dem im vorigen Versuch, nämlich  $91,7/52,9 = 1,73$ .

Tabelle 5. Das N/C-Verhältnis der Nitritbildnerstämme bei 31° C.

Kolben Nr.	Oxydierter N in mg	Gefundener C in mg	N/C- Verhältnis	Alter der Kulturen (Tage)
Stamm 44.				
1	63,6	0,826	77,2	35
2	63,6	0,816	78,1	37
3	63,6	0,792	80,5	38
4	42,4	0,498	85,2	38
5	42,4	0,408	103,6	39
6	42,4	0,468	90,6	40
7	42,4	0,462	91,8	42
8	42,4	0,534	79,4	44
9	42,4	0,402	105,5	44
10	42,4	0,456	93,1	44
11	42,4	0,468	90,6	55
12	42,4	0,414	102,3	58
Sa.	572,4	6,544		
Mittel- wert			87,5	42
Stamm 32.				
1	42,4	0,968	43,8	40
2	42,4	1,022	41,5	41
3	42,4	1,010	42,0	41
4	42,4	0,944	45,0	45
5	42,4	0,902	47,1	45
6	42,4	0,952	44,6	46
7	42,4	0,896	47,4	46
8	42,4	0,896	47,4	58
9	42,4	0,896	47,4	59
10	63,6	1,418	44,9	66
Sa.	445,2	9,904		
Mittel- wert			45,0	48,7

d) Nun setzte ich noch einmal einen ähnlichen Versuch an. 24 Kolben mit je 150 cm<sup>3</sup> bzw. 100 cm<sup>3</sup> Nährlösung dienten zur Anzucht der Bakterien. 12 Kolben wurden mit dem Stamm 32 und die restlichen 12 mit Stamm 44 beimpft. Die Brutschranktemperatur senkte ich auf 31° C, um Ammoniakverluste einzuschränken. Im übrigen waren die Versuchsbedingungen genau die gleichen wie vorher.

Die Tab. 5 bringt die Ergebnisse des Versuches. Von Stamm 44 waren sämtliche Kulturen ausnitrifiziert und konnten für die C-Bestimmung benutzt werden. Bei Stamm 32 verlief die Nitrifikation wieder schlecht, so daß zwei  $\text{NH}_3$ -haltige Kulturen für die Analyse verworfen werden mußten.

Auch in diesem Versuch kommt das unterschiedliche N/C-Verhältnis zum Ausdruck. Entsprechend der etwas besseren Nitrifikation sind die Werte günstiger als im vorigen Versuch. Das Verhältnis der Stämme 44 und 32 untereinander ist annähernd dasselbe wie in den ersten beiden Versuchen, nämlich  $87,5/45,0 = 1,94$ .

Hier könnte ich nun noch weitere Versuche anführen, doch halte ich das für unnötig. Neues brachten sie nicht mehr. Daß ein unterschiedliches N/C-Verhältnis vorhanden ist, darüber besteht kein Zweifel. Wenn nämlich die Nährlösung für beide Nitritbildnerstämme aus derselben Flasche genommen wird, die Kulturkolben mit der Nährlösung gleichzeitig im gleichen Autoklaven sterilisiert werden und während der Nitrifikation im gleichen Brutschrank bei derselben Temperatur stehen und die C-Bestimmungen mit der gleichen Apparatur, mit den gleichen Reagenzien durchgeführt werden, kann die Tatsache über das Bestehen eines unterschiedlichen N/C-Verhältnisses zwischen den beiden Nitritbildnerstämmen nicht geleugnet werden. Die absoluten Werte bedürfen allerdings noch einer Korrektur. Nach dem Sterilisieren, kurz vor der Beimpfung, müßte nämlich der in der Kulturlösung vorhandene oxydierbare Stickstoff und nach beendeter Oxydation der oxydierte Stickstoff genau quantitativ bestimmt werden. Die angegebenen Relativwerte würden sich, wenn überhaupt, wahrscheinlich aber nur wenig verschieben.

Wir haben somit gesehen, daß ein Unterschied im N/C-Verhältnis der beiden Nitritbildnerstämme besteht. Es hat sich auch in den weiteren, hier nicht angeführten Versuchen immer wieder gezeigt, daß die C-Menge der beiden Stämme sich ungefähr wie 2 : 1 verhält. Der Stamm 32 bildet fast doppelt soviel Kohlenstoff bei der Oxydation der gleichen Ammonsulfatmengen wie der Stamm 44.

S. WINOGRADSKY (1906) hat bereits Nitrifikationsbakterien beschrieben, die sich morphologisch unterscheiden ließen. Bei einem eingehenderen Studium über den Belebtschlamm der Pariser Kläranlagen wurden von H. WINOGRADSKY (1937) 7 Nitrit- und 2 Nitratbildnerarten isoliert, die sich durch Zellgröße und verschiedene Wuchsformen auszeichneten. Wieweit die übrigen Literaturangaben über neuentdeckte Arten zutreffen, läßt sich nicht mit Sicherheit feststellen. Zum Teil sind sicher durch unsauberes Arbeiten heterotrophe, nicht nitrifizierende Organismen als Nitrifikationsbakterien beschrieben worden. Durch meine vorliegende Untersuchung ist der Beweis erbracht worden, daß es nicht nur morphologisch, sondern auch physiologisch unterscheidbare Nitritbakterien gibt.



So auffallend der Unterschied der beiden Stämme 32 und 44 hinsichtlich ihres Reduktionsvermögens auch ist, so erschien er mir zur Aufstellung einer neuen Art nicht ausreichend. Ich suchte daher nach weiteren Unterschieden.

#### 4. Der Einfluß der Temperatur.

Schon in meiner 1948 veröffentlichten Arbeit war es mir aufgefallen, daß Stamm 32 bei 30° C rascher nitrifizierte als Stamm 44. Ich ging daher dieser Erscheinung weiter nach und setzte einen Doppelversuch an, der den Temperaturbereich zwischen 40 und 52° C in Abständen

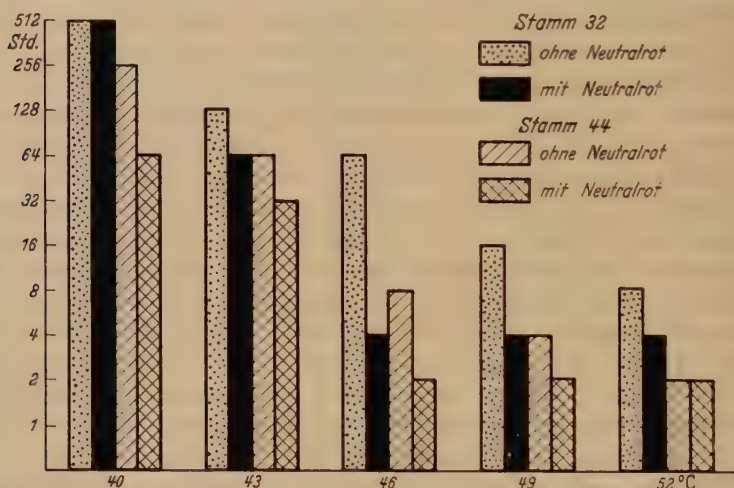


Abb. 2. Einfluß hoher Temperaturen auf die Nitrifizierstämme 32 und 44 in Abwesenheit und Gegenwart von Neutralrot. Die Höhe der Säulen gibt die maximalen Erträglichkeitsgrenzen an.

von 3° C abtasten sollte. In einer früheren Mitteilung (1948) hatte ich den Kulturen zur leichteren Beobachtung des Nitrifikationsverlaufes Neutralrot zugegeben. Um festzustellen, ob dieser Farbstoff ungünstig auf die Bakterien einwirke, benutzte ich die Gelegenheit dieses Versuches und führte ihn in Abwesenheit und Gegenwart von 0.0004 % Neutralrot durch. Ausgedehnt wurde dieser Versuch bis auf 512 Std. Die Versuchsanordnung war folgendermaßen:

Aus großen ERLÉNMEYER-Kolben, die völlig ausnitrifizierte Kulturen enthielten, füllte ich mittels steriler Pipette in vorher trocken sterilisierte Reagensgläser 2 cm<sup>3</sup> Kulturflüssigkeit. Zu den Röhrchen, die länger als 100 Std im Thermostaten verblieben, setzte ich soviel steriles destilliertes Wasser zu, wie ungefähr während der Versuchsdauer verdunsten würde (durch Vorversuche ermittelt). Dadurch wurde eine Schädigung der Bakterien durch Konzentrationserhöhung der Nährlösung weitgehend verhindert. Aus allen Röhrchen wurde nach der Temperaturbehandlung in ERLÉNMEYER-Kölben mit der üblichen Nährlösung abgeimpft. Zeigte die Rückimpfung keine Nitrifikation, so galt die Kultur als geschädigt.

Ein Zusatz von 0,0004% Neutralrot zur Nährlösung ruft bei beiden Bakterienstämmen eine deutliche Schädigung hervor, wie die Abb. 2 zeigt. Wir sehen ferner, daß ein Unterschied beider Stämme bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Neutralrot besteht. Der Stamm 44 wird wesentlich stärker geschädigt als der Stamm 32. Ebenso erkennen wir einen Unterschied in der Temperaturverträglichkeit. Der kritische Tötungspunkt für langfristige Versuche dürfte bei Stamm 32 etwas höher als 40° C und für den Stamm 44 etwas niedriger als 40° C liegen. Eine 512stündige Einwirkung von 40° C hatte bei Stamm 32 in keinem Röhrchen ein Absterben der Bakterienzellen zur Folge; sämtliche Abimpfungen nitrifizierten, sowohl die mit Neutralrot-Zusatz als auch die ohne diesen Farbstoff. Der Versuch zeigt uns weiter, daß mit Temperaturerhöhung die Lebensdauer der Bakterien verkürzt wird.

### 5. Das Temperaturmaximum von Stamm 32.

Die Frage nach dem Temperaturmaximum beim Nitritbildner ist bereits von verschiedenen Forschern bearbeitet worden. So geben BOULLANGER und MASSOL (1903) an, daß die Nitritbildner bei 45° C innerhalb 5 min absterben. BONAZZI (1919) berichtet von einem *Nitrosococcus* aus einem Boden in Ohio, der eine Temperatur von 55° C für 5—10 min ertrug, während *Nitrosomonas*zellen ein 5 min langes Erhitzen zwischen 40 und 50° C nicht lebend überstanden.

Um das Temperaturmaximum für den Nitritbildnerstamm 32 festzustellen, setzte ich einen Versuch mit 56 ERLÉNMEYER-Kölbchen zu je 25 cm<sup>3</sup> Nährlösung an, beimpfte sie und ließ sie im Thermostaten bei 35° C das Ammoniak restlos oxydieren. Nach beendeter Nitrifikation kamen sämtliche Kulturen der Reihe nach in ein annähernd konstant gehaltenes Wasserbad und blieben jeweils bei den in der Tab. 6 angegebenen Temperaturen und Zeiten darin. Die Temperatur wurde in der Kulturflüssigkeit gemessen. Von diesen so vorbehandelten Kulturen impfte ich mit einer Platinöse in die übliche *Nitrosomonas*nährlösung zurück. Nitrifizierte die Abimpfung, so galt die Kultur als lebend und erhielt in der Tabelle ein Pluszeichen, versagte die Nitrifikation, so erhielt sie ein Minuszeichen.

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt die Tab. 6. Genau nach einer

Tabelle 6. Stamm 32. Einfluß der Temperatur.

Min.	50°	55°	60°	65°
1	+	+	+	—
2	+	+	+	—
3	+	+	+	—
4	+	+	+	—
5	+	+	+	—
6	+	+	—	—
7	+	+	—	—
8	+	+	—	—
9	+	+	—	—
10	+	+	—	—
15	+	+	—	—
20	+	+	—	—
25	+	+	—	—
30	+	+	—	—

+ lebende Nitritbildnerzellen,  
— tote.

5 min langen Einwirkungsdauer von 60° C ist die Erträglichkeitsgrenze erreicht. Alle Abimpfungen von Kulturen, die bei 60° C länger als 5 min gehalten worden waren, nitrifizierten nicht mehr. Ebenso nitrifizierte nicht eine Abimpfung von Kulturen, die auch nur 1 oder 2 min auf

65° C erhitzt gewesen war. Temperaturen von 50 und 55° C wurden dagegen ohne Schaden ertragen.

### 6. Natriumchlorid.

LIPMAN (1912) fand, daß 0,2% NaCl bereits die Nitrifikation verlangsamt und 0,4% dieselbe völlig unterbindet. OMELIANSKI (1899) behauptet, ein NaCl-Zusatz von 0,2% fördere wesentlich die Nitrifikation. Nach den Angaben von GIBBS (1919) hemmt eine 1%ige NaCl-Lösung den Nitrifikationsvorgang. THOMSON (1907) konnte zeigen, daß die Nitrifikation in Versuchen mit Schlickproben aus der Kieler Förde bei Zusatz von 2% Meersalz begann, bei 4% dieses Salzes wurde die Nitritbildung sehr gehemmt und bei 5% Seesalz verlief sie nicht mehr vollständig. RUBENTSCHIK (1929) berichtet von einem ausgesprochen halophilen *Nitrosomonas*-stamm, der bei 1% seine minimale, bei 5% seine optimale und bei 15% seine maximale Salzkonzentration hatte. Aus obigen Angaben ersieht man, wie verschieden die einzelnen Nitrifikationserreger auf NaCl reagieren. Daher schien es mir angebracht, auch meine Nitrifikantenstämme nach dieser Richtung hin zu untersuchen.

Tabelle 7. Stamm 32 und 44.  
Einfluß von NaCl.

Na Cl %	32	44
0,8	+	+
1,0	+	+
1,2	+	+
1,4	+	—
1,6	+	—
1,8	+	—
2,0	+	—
2,2	+	—
2,4	+	—
2,6	+	—
2,8	+	—
3,0	+	—
3,2	—	—

+ lebende Nitritbildnerzellen,  
— tote.

Nach einem groben Orientierungsversuch wurde der NaCl-Versuch mit den beiden Nitritbildnerstämmen 32 und 44 in ERLÉNMEYER-Kölbchen mit der entsprechenden Nährlösung und mit dem in der Tab. 7 angegebenen NaCl-Zusatz ausgeführt. Sämtliche Kulturen standen 7 Wochen lang im gleichen Thermostaten bei 30° C. Nach dieser Frist erfolgte die Rückimpfung in die übliche Nitrifikationsnährlösung.

Das Versuchsergebnis bringt die Tab. 7. Während der Stamm 32 bei Gegenwart von 3% NaCl das gebotene Ammonsalz innerhalb 7 Wochen restlos oxydierte, waren bei Stamm 44 nur die Kölbchen mit einem Zusatz von 1,2% NaCl und niedriger ammoniakfrei. Eine höhere NaCl-Konzentration als 1,2% hemmt bei Stamm 44 offensichtlich den Nitrifikationsvorgang. Für Stamm 32 setzt die gleiche Hemmwirkung erst oberhalb 3% ein. Dieser Versuch bestätigt also wiederum die Verschiedenheit beider Nitritbildnerstämme. Es ist somit der eurythermere und „carbophilere“ Stamm 32 auch der halotolerantere!

### 7. Morphologie der Nitritbildnerstämme.

Stamm 32 und 44 unterschieden sich auch deutlich in morphologischer Hinsicht. 32 war merklich kleiner als 44 und seine Zellen wiesen eine gewisse Unregelmäßigkeit in Form und Größe auf, was bei 44 nicht der Fall war. Stamm 32 zeigte die gleichen unregelmäßigen Formen, wie WINOGRADSKY (1906) sie für den Nitritbildner aus Zürich in LAFARS Handbuch der Technischen Mykologie Bd. III, Tafel III, Fig. 1 angibt. Wahr-



scheinlich sind beide identisch. Die Bakterien des Stammes 44 wiesen die regelmäßige Gestalt des Nitritbildners aus Genevilliers bei Paris auf (Abbildung im gleichen Handbuch auf der gleichen Tafel, Fig. 2), und möglicherweise sind auch diese identisch.

Die Identität von Stamm 32 mit *Nitrosomonas europaea* Win. geht auch aus dem übereinstimmenden N/C-Verhältnis beider hervor. Außer WINOGRADSKY isolierten BOLTJES und auch ich dieses nitrifizierende Bakterium, das sich streng autotroph ernährt und ein ziemlich konstantes N/C-Verhältnis um 35/1 aufweist.

Den Nitritbildnerstamm 44 halte ich auf Grund seiner deutlichen morphologischen und besonders physiologischen Unterschiede gegenüber *Nitrosomonas europaea* Win. für eine besondere *Nitrosomonas*art. Diese wurde anscheinend erstmalig von HEUBÜLT (1929) isoliert und von ENGEL (1929, 1930) auf seine C-Assimilation geprüft. Darauf wurde sie ein zweites Mal von ENGEL und SKALLAU (1937) nach dem Verdünnungsverfahren aus Berliner Gartenerde in Reinkultur gebracht und später von mir auf sein N/C-Verhältnis hin untersucht. Dieses streng autotrophe, nitrifizierende Bakterium bildet Schwärmer (s. ENGELS u. meine Angaben 1948) und verarbeitet im Vergleich zur *Nitrosomonas europaea* weniger Kohlenstoff (N/C-Verhältnis 70/1) bei der Oxydation gleicher Ammoniakmengen. Ich halte es daher für angebracht, dieses schwärmerbildende, nitrifizierende Bakterium *Nitrosomonas oligocarbogenes* zu nennen.

### Zusammenfassung.

1. Es werden 2 Nitritbildner besprochen. Das eine nitrifizierende Bakterium wurde als *Nitrosomonas europaea* identifiziert; es hat ein N/C-Verhältnis von etwa 35/1.

2. Das andere, ein ebenfalls autotrophes, nitrifizierendes Bakterium, stellt eine neue Art dar und wird mit dem Namen *Nitrosomonas oligocarbogenes* belegt. Es bildet Schwärmer und hat ein N/C-Verhältnis von etwa 70/1. Es verträgt nicht so hohe Temperaturen und Salzkonzentrationen wie die *Nitrosomonas europaea*.

### Literatur.

- BOLTJES, K.: Arch. Mikrobiol. **6**, 79 (1935). — BÖMEKE, H.: Arch. Mikrobiol. **10**, 385 (1939); **14**, 63 (1948). — BONAZZI, A.: Bot. Gaz. **68**, 194 (1919). — BOULANGER, E., u. L. MASSOL: Ann. Inst. Pasteur **18**, 181 (1903). — ENGEL, H.: Arch. Mikrobiol. **1**, 445 (1930); Planta (Berl.) **8**, 423 (1929); **12**, 60 (1931); Meth. d. Fermentforschg **4**, 2706 (1941). — ENGEL, H., u. W. SKALLAU: Zbl. Bakter. II, **97**, 305 (1937). — GIBBS, W. M.: Soil Sci. **8**, 427 (1919). — HES, J. W.: Rec. des trav. bot. néerl. **34**, 233 (1937). — HEUBÜLT, J.: Planta (Berl.) **8**, 398 (1929). — LIPMAN, Chas. B.: Zbl. Bakter. II, **33**, 305 (1912). — MEYERHOF, O.: Pflügers Arch. **166**, 240 (1917). — MOTHES, K.: Z. Bot. **22**, 462 (1930). — NELSON, D. H.: Zbl. Bakter. II, **83**, 280 (1931). — OMELIANSKI, W.: Zbl. Bakter. II, **5**, 473 (1899). — RUBENTSCHIK, W.: Zbl. Bakter. II, **77**, 1 (1929). — THOMSON, P.: Ber. dtsh. bot. Ges. **25**, 16 (1907). — WINOGRADSKY, H.: Ann. de l'Inst. Pasteur **58**, 326 (1937). — WINOGRADSKY, S.: in Lafars Handb. d. techn. Mykologie **3**, 132 (1906).



(Aus dem Botanischen Institut der Universität München.)

## Über eine neue Beeinflussung der Sporangienentwicklung von *Phycomyces* durch Paraffinöl.

Von

HUBERT ZIEGLER.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 25. Juli 1950.)

GOETZE (1919) kommt auf Grund ihrer Versuche über die Beeinflussung der Differenzierungsprozesse bei *Phycomyceten* zu der Überzeugung, daß die Entwicklung der *Phycomyces*-Sporangien nur in jungem Zustande



Abb. 1. Keimung der Sporen in einem Sporangium von *Phycomyces Blakesleeanus* nach 60 stündiger Bedeckung der Kultur mit Paraffinöl; vergrößert.

und vor dem Erreichen der definitiven Größe gehemmt oder in andere Bahnen gelenkt werden könne.

Untersuchungen an Sporangien von *Phycomyces Blakesleeanus*, die sich längere Zeit unter Paraffinum liquidum befunden hatten, zeigten nun, daß auch in späteren Entwicklungsstadien noch Richtungsänderungen der Differenzierung verursacht werden können. So wurden bei einer Kultur, die auf Brot gezogen und nach der Ausbildung der

Sporangien unter Paraffinöl gebracht worden war, nach 7tägigem Aufenthalt in diesem Medium mehrere Fälle beobachtet, in denen ein Sporangium der definitiven Größe mit ausgebildeter Columella und im zentralen Teil schon teilweise abgegrenzten Sporen myzeliale Auswüchse der Sporangienwand zeigte. Diese erweiterten sich in einem Falle zu einem sporangienartigen Gebilde, das ausgebildete Sporen enthielt.

Eine andere bemerkenswerte Erscheinung, die allerdings nur einmal an zahlreichen Sporangien einer  $2\frac{1}{2}$  Tage unter Paraffinöl befindlichen Kultur festgestellt werden konnte, war ein Auskeimen der Sporen im Sporangium, wobei die gebildeten Hyphen die Sporangienwand durchbrachen. Diese seltsame Art von „Viviparie“ gibt nebenstehende Abbildung wieder.

Die Ergebnisse zeigen, daß auch nach bereits begonnener Ausbildung der Sporen aus Teilen des *Phycomyces*-Sporangiums myzeliale Bildungen hervorgehen können und daß die unbekannten Einflüsse, die normalerweise ein Auskeimen der Sporen im Sporangium verhindern, durch Außeneinwirkungen ausgeschaltet werden können.

#### Literatur.

GOETZE, H.: Jahrb. f. wiss. Bot. 58, 337 (1919).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität München.)

## Über den Einfluß von Bodenbakterien und deren Filtraten auf das Wachstum in vitro kultivierter Wurzeln.

Von

OTTO KANDLER.

(Eingegangen am 2. August 1950.)

Seit den Arbeiten HILTNERs (1904), in denen erstmalig der Ausdruck „Rhizosphäre“ gebraucht wird, ist die Literatur über die Wechselwirkung zwischen Bodenbakterien und Pflanzenwurzel zu einer kaum übersehbaren Fülle angeschwollen. Hier soll nur auf eine Arbeit von STILLE (1938) hingewiesen werden, der die Rhizosphäre in vitro synthetisieren konnte und sie damit sehr anschaulich darstellte. Einen umfassenden Überblick über das neuere Schrifttum gaben vor kurzem KATZNELSON u. Mitarb. (1948), auf die hier verwiesen sei. Trotz der Fülle von Einzeltatsachen, die bisher zusammengetragen wurden, konnte doch keine klare Vorstellung über die zweifellos vorhandene gegenseitige Beeinflussung von Mikroorganismen und Wurzeln entwickelt werden.

Über die grundsätzliche Nützlichkeit der stickstoffbindenden Bodenbakterien besteht natürlich kein Zweifel. Die umfangreichen Arbeiten zur Anwendung der Bodenimpfung in der landwirtschaftlichen Praxis, wie sie kürzlich POSCHENRIEDER (1949) in einem Sammelreferat zusammenfaßte, zeigten aber eine so ausgeprägte Spezifität einzelner Bakterienstämme für bestimmte Pflanzenarten, daß man neben den rein ernährungsphysiologischen Faktor auch noch die Annahme einer Wirkstoffbeeinflussung setzen mußte.

Die Kultur isolierter Wurzeln auf synthetischen Nährböden erschien mehr als jede andere Methode dazu geeignet, weitere Beiträge zu diesem Problem zu liefern. Bereits KRASILNIKOF u. GARKINA (1939) untersuchten den Einfluß verschiedener Bodenbakterien und Pilze auf das Wachstum isolierter Weizen- und Erbsenwurzeln. Leider blieb diese Arbeit auf Grund der schwierigen Zeitverhältnisse in der westlichen Literatur bis 1948 unberücksichtigt und wurde auch dem Verfasser vorliegender Arbeit erst nach Abschluß derselben bekannt. Inwieweit die Befunde KRASILNIKOFs mit den eigenen Ergebnissen übereinstimmen oder davon abweichen, soll später diskutiert werden. Zweck vorliegender Untersuchung war es, in reproduzierbaren Versuchen die Wirkstoffnatur der Wachstumsbeeinflussung isolierter Wurzeln durch Bodenbakterien sicher-

zustellen. Die Frage nach der Spezifität der Bakterienwirkung und dem Einfluß der Wurzelausscheidungen auf die Bakterien sind Gegenstand weiterer Untersuchungen am hiesigen Institut.

### A. Material und Methodik.

Die Samen wurden durch Einlegen in konzentriertes Bromwasser (Maiskörner 10 min, Leguminosensamen 45 min) sterilisiert und dann auf einer 5 mm dicken Agarschicht in Petrischalen bei 29° C angekeimt. Hatten die Keimwurzeln eine Länge von 20—30 mm erreicht, so wurde eine 8—10 mm lange Spitze abgeschnitten und unter sterilen Kautelen auf die Nährböden übertragen.

Der Nährboden hatte folgende Zusammensetzung: 1000 cm<sup>3</sup> Aquabidest; 360 mg MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 200 mg Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O; 200 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 80 mg KNO<sub>3</sub>; 65 mg KCl; 16 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; Spur Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>; 1 cm<sup>3</sup> HOAGLANDSche A-Z-Lösung; 15 g Agar; 20 g Glucose.

Als Kulturgefäße dienten normale Reagensgläser, in denen der Agar schräg erstarrt war. Die Sterilisation wurde im Dampftopf an 3 aufeinanderfolgenden Tagen vorgenommen. Die Kultur erfolgte in einem Dunkelthermostaten oder bei größeren Versuchsreihen in der Klimakammer bei 30° C.

Um sterile Bakterienfiltrate zu erhalten, wurden die Bakterien in einem flüssigen Nährboden (1000 cm<sup>3</sup> Leitungswasser; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g CaCO<sub>3</sub>; 0,2 g MgSO<sub>4</sub>; 2 % Glucose) in ERLLENMEYER-Kölbchen 14 Tage bei 30° C kultiviert und die Suspension mit einem Membranfilter (Fabrikat der Membranfiltergesellschaft Göttingen, Modell „Coli“ Nr. 5) abfiltriert. Das sterile Filtrat wurde dann nach dem Sterilisieren dem noch flüssigen Nährboden in entsprechender Menge zupipettiert.

### B. Versuchsergebnisse.

#### a) Wirkung direkter Bakterienbeimpfung auf isolierte Wurzeln.

Aus den im Laufe der Zeit gesammelten Erfahrungen mit Gewebe- und Wurzelkulturen verschiedener Art stand die Tatsache fest, daß jede Infektion der Kulturen mit Bakterien oder Pilzen das Wachstum hemmt und zum Absterben der Gewebe führt. Es sollte aber zunächst doch die Wirkung verschiedener besonders häufiger Bodenbakterien systematisch untersucht werden. Dazu wurden 2 Tage alte Kulturen von Maiswurzeln mit *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis* und *mycoides* oder *Bacterium radicicola* beimpft. Die Bakterien entwickelten sich sehr rasch, umgaben schon nach 3 Tagen die ganze Wurzel mit einer schleimigen Hülle und breiteten sich auch auf dem Nährboden aus. Das Wurzelwachstum blieb in allen Fällen weit hinter den Kontrollwerten zurück. Tab. 1 zeigt eine Zusammenstellung der Durchschnittswerte von je 10 Wurzeln, wie sie sich nach 14tägiger Kulturdauer ergaben. Die gehemmten Wurzeln



zeigten charakteristische Anschwellungen des Rindenparenchyms und wurden gegen Ende der Kulturdauer gelblich bis braun.

Tabelle 1.

*Einfluß direkter Bakterienbeimpfung auf das Längenwachstum isolierter Maiswurzeln*

Art der Bakterien	Ausgangslänge cm	Endlänge cm	Zuwachs cm
<i>Azotobacter chroococcum</i> . . . . .	1,0	2,32	1,32
<i>Bacillus subtilis</i> . . . . .	1,0	2,16	1,16
<i>Bacillus mycoides</i> . . . . .	1,0	2,71	1,71
<i>Bacterium radicicola</i> . . . . .	1,0	2,12	1,12
Kontrolle . . . . .	1,0	7,88	6,88

Während obige Versuche mit normalen Nährböden ausgeführt worden waren, sollte nun versucht werden, ob *Azotobacter* auf Grund seiner Fähigkeit, Luftstickstoff zu binden, auf stickstoffarmen Nährböden eine Förderung auszulösen vermag. Zu diesem Zweck kamen alle stickstoffhaltigen Salze der Nährlösung in Wegfall. Das gleichzeitig damit entfallende Ca wurde in Form von  $\text{CaCl}_2$  in äquivalenter Menge wieder zugesetzt. Alle anderen Bestandteile des Nährbodens blieben unverändert. Als Versuchsobjekte dienten sowohl Bohnen- als auch Maiswurzeln. Die Beimpfung erfolgte mit 2 verschiedenen Stämmen von *Azotobacter chroococcum*<sup>1</sup>, die sich bei Bodenimpfungen in der Praxis besonders gut bewährt hatten. In den Tab. 2 und 3 sind die Durchschnittswerte der Endlängen nach 14-tägiger Kulturdauer wiedergegeben.

Tabelle 2. *Einfluß von Azotobacter chroococcum auf das Längenwachstum isolierter Bohnenwurzeln, die auf stickstoff-freiem Substrat kultiviert wurden.*

<i>Azotobacter chroococcum</i>	Ausgangslänge cm	Endlänge cm	Zuwachs cm
Stamm 1 . . . . .	0,7	1,85	1,15
Stamm 2 . . . . .	0,5	2,30	1,80
Kontrolle . . . . .	0,7	4,00	3,30

Wie die Tab. 2 und 3 zeigen, erfolgte auch auf stickstofffreiem Nährboden nicht nur keine Förderung, sondern sogar eine deutliche Hemmung. Dabei erwies sich Stamm 1 wirksamer als Stamm 2. Erwartungsgemäß war der Zuwachs auch in den Kontrollen nur sehr gering, da nur der in den Wurzelspitzen vorhandene Stickstoff zur Verfügung stand. Die Wurzeln entwickelten sich zu dünnen, fädigen Gebilden und stellten nach Erschöpfung der Stickstoffreserven ihr Wachstum ein. Die beimpften Wurzeln waren von den Bakterien dicht umwachsen und wieder etwas dicker als die Kontrollen.

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. SAWOSTIN bin ich für die Überlassung der *Azotobacter*-Stämme zu großem Dank verpflichtet.

Tabelle 3. Einfluß von *Azotobacter chroococcum* auf das Längenwachstum isolierter Maiswurzeln, die auf stickstofffreiem Substrat kultiviert wurden.

Azotobacter chroococcum	Ausgangs- länge cm	Endlänge cm	Zuwachs cm
Stamm 1 . . . . .	0,8	1,9	1,1
Stamm 2 . . . . .	0,8	2,5	1,7
Kontrolle . . . . .	0,8	4,2	3,4

Bei Kulturen von Leguminosenwurzeln war es naheliegend, auf die Entstehung von Wurzelknöllchen zu achten. LEWIS u. MCCOY (1933) hatten schon vor längerer Zeit im Rahmen von Untersuchungen über die Abhängigkeit der Knöllchenbildung von der Kohlenhydratversorgung der Pflanze auch mit isolierten Wurzeln gearbeitet und dabei in einem einzelnen Falle eine Knöllchenbildung durch Infektion mit *Bacterium radicola* erzielt. Weitere Bestätigungen dieses Befundes liegen seither nicht mehr vor. In eigenen Versuchen wurde so verfahren, daß gut entwickelte Kulturen von Erbsen-, Bohnen- und Lupinenwurzeln mit entsprechenden Stämmen von *Bacterium radicola*<sup>1</sup> infiziert wurden. Dies erfolgte durch Bestreichen der Wurzeln mit einer Öse voll Bakterien bzw. durch Anstechen der Wurzel mit einer infizierten Nadel. Schon in wenigen Tagen verbreiteten sich die Bakterien über die ganze Wurzel und den Nährboden und führten zu den üblichen Wachstumshemmungen. Durch sehr vorsichtiges Anstechen der Wurzel gelang es zwar, die Infektionsherde so klein zu halten, daß bis zu einer wesentlichen Ausbreitung der Bakterien 8—10 Tage vergingen, in denen die Wurzeln ganz normal weiter wuchsen, aber auch in diesen Fällen kam es in keinem Fall zur Bildung von Knöllchen.

Da GÄUMANN u. Mitarb. (1945) in neuerer Zeit zeigen konnten, daß in Wasserkulturen die Häufigkeit der Knöllchenbildung durch Verminderung der Stickstoffgaben wesentlich erhöht werden kann, wurden mehrere Versuchsreihen angesetzt, bei denen Nährböden mit abgestuften Stickstoffkonzentrationen einschließlich vollständig stickstofffreier Proben verwendet wurden. Auch diese Versuche verliefen negativ. Offensichtlich bietet der Nährboden den Bakterien zu günstige Bedingungen, als daß sie in die Wurzel selbst eindringen würden. Weitere Versuche mit dieser Methodik erschienen daher zwecklos.

#### b) Wirkung von Bakterienfiltraten auf isolierte Wurzeln.

Als Ursache der durch die Bakterien hervorgerufenen Wachstumshemmungen lassen sich 3 Möglichkeiten heranziehen.

1. Die Bakterien entziehen den Wurzeln den gebotenen Zucker und stellen damit eine Nahrungskonkurrenz dar.

<sup>1</sup> Herrn Dr. H. POSCHENRIEDER bin ich für die Besorgung verschiedener Stämme von *Bact. radicola* zu großem Dank verpflichtet.

2. Durch die reichliche Schleimproduktion der Bakterien wird die Wurzel vom Nährboden abgesperrt.

3. Die Bakterien produzieren Wirkstoffe, die in starken Konzentrationen für die Wurzeln schädlich sind.

Punkt 1 und 2 sind sicherlich nicht ganz ohne Bedeutung, können aber nicht erklären, daß die gehemmten Wurzeln anschwellen. Auch die Verfärbung der Wurzeln und das baldige Absterben lassen sich schlecht nur als Folge von Nahrungsmangel deuten. Daher galten weitere Versuche der Klärung von Punkt 3. Der einfachste Weg dazu bestand darin, daß die Bakterien nicht mehr unmittelbar auf die Wurzeln geimpft wurden, sondern daß den Wurzelnährböden bakterienfreie Filtrate zugesetzt wurden. Waren tatsächlich Wirkstoffe produziert worden, so mußten sie sich auch jetzt noch durch eine Wachstumsbeeinflussung zu erkennen geben. Außerdem war mit dieser Methode die Möglichkeit gegeben, die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung zu prüfen.

Als eventuell auftretender Wirkstoff war von vorneherein  $\beta$ -Indolyl-essigsäure (IES) wahrscheinlich, da diese bei Wurzelkulturen in stärkeren Konzentrationen neben einer Wachstumshemmung die gleichen charakteristischen Verdickungen hervorruft, wie unter anderem GEIGER-HUBER u. BURLETT (1936) und KANDLER (1950) zeigen konnten, und die Produktion derselben durch Mikroorganismen wiederholt (siehe das Sammelreferat von JANKE 1939) nachgewiesen wurde. Bekanntlich ist Tryptophan eine wichtige Vorstufe der IES-Synthese, und auf tryptophanreichen Nährböden wird in erhöhtem Umfang IES gebildet. Daher kamen in vorliegenden Versuchen stets 2 verschiedene Bakteriennährböden zur Verwendung. Während der eine die eingangs angegebene Zusammensetzung besaß, erhielt der andere einen Zusatz von 0,3% Pepton, das bekanntlich besonders reich an Tryptophan ist. Bei den Filtraten des 2. Nährbodens war also eine verstärkte Wirkung zu erwarten.

Tabelle 4. Einfluß des 1:10 verdünnten Filtrats von *Azotobacter chroococcum* auf isolierte Erbsenwurzeln. (Bakteriennährlösung mit Zusatz von 0,3% Pepton Witte.)

Azotobacter chroococcum	Ausgangslänge cm	Endlänge cm	Zuwachs cm
Stamm 1 . . . . .	0,9	6,20	5,30
Stamm 2 . . . . .	0,9	6,70	5,80
Kontrolle . . . . .	0,9	9,78	8,88

Zunächst kamen die beiden bereits oben erwähnten Stämme von *Azotobacter chroococcum* einerseits, Erbsenwurzeln andererseits zur Verwendung. Zu je 9 cm<sup>3</sup> Wurzelnährboden kam ein Zusatz von 1,0 cm<sup>3</sup> Bakterienfiltrat, so daß eine Verdünnung 1:10 vorlag. Die Kontrollen erhielten einen entsprechenden Zusatz der ursprünglichen Bakterien-

nährlösungen. Die Durchschnittswerte der Endlängen von je 10 Wurzeln nach 14 tägiger Kultur sind in den Tab. 4 und 5 zusammengestellt.

Tabelle 5. Entsprechend der Tabelle 4, aber ohne Peptonzusatz.

Azotobacter chroococcum	Ausgangslänge cm	Endlänge cm	Zuwachs cm
Stamm 1 . . . . .	1,0	4,51	3,51
Stamm 2 . . . . .	1,0	4,81	3,81
Kontrolle . . . . .	1,0	5,43	4,43

Aus den Tabellen geht deutlich hervor, daß auch die Filtrate eine Wachstumshemmung hervorrufen. Dabei erweist sich wie in den Tab. 2 und 3 der Stamm 1 wieder wirksamer als Stamm 2. Vergleicht man die Zuwachswerte der Kontrollen, so ergibt sich bei der Probe mit Peptonzusatz eine erhebliche Förderung gegenüber dem normalen Nährboden. Dies ist bei Leguminosenwurzeln eine allgemeine Erscheinung, während bei Maiswurzeln ein Peptonzusatz schädlich wirkt, wie Tab. 6 zeigen wird. Berechnet man die prozentuale Hemmung des Längenzuwachses für die Probe mit Pepton, so ergeben sich 45% bzw. 37,5%, während sie bei der Probe ohne Pepton nur 21% bzw. 17% beträgt. Dieser Befund spricht dafür, daß bei Anwesenheit von Pepton tatsächlich eine größere Wirkstoffmenge produziert wurde.

Nachdem sich nun die Vermutung, daß eine Wirkstoffwirkung vorlag, bestätigt hatte und die Annahme, daß es sich bei dem Wirkstoff um IES handeln könnte, verstärkt worden war, sollte bei einem weiteren Versuch die Konzentrationsabhängigkeit und die Thermolabilität des Wirkstoffs untersucht werden. Zur Verwendung kam ein Stamm von *Bacillus subtilis* und Maiswurzeln. Die Filtrate wurden in 3 Verdünnungsstufen (1:10; 1:100; 1:1000) zugegeben. Eine weitere Reihe, die eine Verdünnung von 1:10 enthielt, wurde vor dem Anlegen der Kulturen noch 3 mal je 45 min unter 1 Atm. Druck sterilisiert. Die Ergebnisse zeigen die Tab. 6 und 7.

Tabelle 6. Einfluß des Filtrats von *Bacillus subtilis* auf das Längenwachstum isolierter Maiswurzeln. (Bakteriennährlösung mit Zusatz von 0,3% Pepton Witte.)

Konzentration	Anfangslänge cm	Endlänge cm	Zuwachs cm
1:10 . . . . .	0,8	3,78	2,98
1:100 . . . . .	0,8	6,38	5,58
1:1000 . . . . .	0,8	5,80	5,00
1:10 3 mal je 45 min erhitzt. . . . .	0,8	5,00	4,20
Kontrolle . . . . .	0,8	5,76	4,96

In den Proben mit Peptonzusatz bewirkte, wie Tab. 6 zeigt, die stärkste Konzentration eine starke Hemmung, während die nächst niedere eine schwache Förderung (~ 20%) hervorrief und die schwächste wirkungslos



blieb. Bei der erhitzten Probe war die Hemmwirkung zwar deutlich abgeschwächt, aber nicht restlos beseitigt. Aus Tab. 7 geht hervor, daß bei den Proben ohne Peptonzusatz bereits die stärkste Konzentration eine Förderung von  $\sim 30\%$  auslöste, die schwächeren aber unwirksam waren. Auch hier ging durch Erhitzen der größte Teil der Wirksamkeit verloren.

Tabelle 7. Wie Tabelle 6, aber ohne Peptonzusatz.

Konzentration	Anfangs- länge cm	Endlänge cm	Zuwachs cm
1:10 . . . . .	0,8	9,54	8,74
1:100 . . . . .	0,8	7,70	6,90
1:1000 . . . . .	0,8	7,50	6,70
1:10 3 mal je 45 min erhitzt. . . . .	0,8	7,98	7,18
Kontrolle . . . . .	0,8	7,62	6,82

Wie im vorhergehenden Versuch zeigt sich auch hier wieder die verstärkte Wirkstoffbildung bei Zusatz von Pepton. Außerdem ergibt sich aber, daß Hemmung und Förderung wie bei IES nur eine Frage der verwendeten Konzentration sind. Der Befund, daß durch Erhitzen die Wirksamkeit stark herabgesetzt wird, deckt sich ebenfalls gut mit der Annahme, daß es sich um IES handelt, da diese bekanntlich ebenfalls stark thermolabil ist.

Eine weitere Möglichkeit, die Beteiligung der IES wahrscheinlich zu machen, bestand darin, das Filtrat im sauren pH-Bereich mit Äther auszuschütteln. Dabei ginge die IES in den Äther und die Wirksamkeit des Filtrats müßte nachlassen. Versuche dieser Art blieben jedoch erfolglos, da es nicht gelang, nach dem Ausschütteln den Äther wieder restlos aus dem Filtrat zu entfernen. Selbst nach stundenlangem Evakuieren blieben geringe Spuren des Äthers oder Beimengungen desselben im Nährboden zurück und hemmten das Wurzelwachstum so stark, daß die Versuche nicht ausgewertet werden konnten.

### C. Diskussion.

In der bereits eingangs erwähnten Arbeit stellte KRASILNIKOF fest, daß Filtrate von *Azotobacter chroococcum* das Wachstum isolierter Erbsen- und Weizenwurzeln hemmen, solche von *Azotobacter Vinelandii* dagegen fördern. Im Avenatest erwies sich nur das Filtrat von *A. chroococcum* als wirksam, das von *A. Vinelandii* war unwirksam. Da er auch nach 20minütigem Erhitzen der Filtrate noch eine Hemmwirkung fand und die Ansicht vertritt, daß auxinartige Stoffe auf jeden Fall eine Wachstumsförderung hervorrufen müßten, kommt er zu dem Schluß, daß es sich bei den beobachteten Effekten nicht um Wirkungen von Stoffen dieser Gruppe handeln könne.

Nach unserer Vorstellung bestätigen jedoch gerade die Befunde von KRASILNIKOF die Beteiligung von „Auxin“ an der Wachstumsbeein-

flussung, denn im Avenatest sind nur relativ starke Konzentrationen wirksam, die auf das Wurzelwachstum bereits hemmend wirken, wie dies auch in den Versuchen KRASILNIKOFs der Fall ist. Die Unwirksamkeit des 2. Filtrats im Avenatest sagt aber nichts dagegen aus, daß nicht doch geringe Spuren von „Auxin“ vorhanden sind, die bei den viel empfindlicheren Wurzeln noch Förderungen auslösen. Daß KRASILNIKOF keine Inaktivierung des Wirkstoffes durch Erhitzen feststellen konnte, beruht vielleicht darauf, daß er nur einmal 20 min lang erhitzte, während in den eigenen Versuchen 3mal je 45 min unter Druck erhitzt wurde. Es muß allerdings noch einmal bemerkt werden, daß in den eigenen Versuchen auch keine restlose Inaktivierung erreicht wurde. Man muß daher annehmen, daß es sich zwar im Wesentlichen um eine IES-Wirkung handelt, aber durchaus noch andere Stoffe beteiligt sein können, deren Einfluß allerdings viel geringer ist und mit der hier verwendeten Methode wohl kaum erfaßt werden kann. Zu ganz ähnlichen Ergebnissen kam auch KRONBERGER (1949) in einer nach Abschluß vorliegender Untersuchungen erschienenen Arbeit. Auf Grund von Versuchen mit verschiedenen Keimpflanzen und *Azotobacter* kommt er zu der Überzeugung, daß es sich bei der unterschiedlichen Wirksamkeit verschiedener Stämme nicht um qualitative, sondern nur um quantitative Unterschiede in der Wirkstoffproduktion handelt, und vermutet ebenfalls IES als Hauptbestandteil des Wirkstoffes.

Auf Grund der hier berichteten Ergebnisse läßt sich folgendes Bild der natürlichen Verhältnisse im Boden entwerfen: Im Boden sind die Bakterien der Rhizosphäre auf die geringen Mengen organischen Materials angewiesen, das die Wurzeln durch Abschülfern der Rinde und Ausscheidung noch nicht näher definierbarer Substanzen liefern. Daher vermögen sie nicht wie bei den Wurzelkulturen üppig zu wuchern, und ihre Wirkstoffproduktion bleibt in der Regel auf Mengen beschränkt, die für die Wurzeln förderlich sind. Die Spezifität von Bakterienstamm und Wurzel ergibt sich aus den bei verschiedenen Pflanzenarten andersartigen Wurzelausscheidungen einerseits und den unterschiedlichen Ernährungsansprüchen der Bakterien andererseits. Da die Wirkstoffproduktion der Bakterien von der Art ihrer Ernährung abhängig ist, erscheint es verständlich, daß der gleiche Bakterienstamm bei einer Pflanzenart hemmend, bei einer anderen dagegen fördernd wirken kann.

### Zusammenfassung.

1. Direkte Beimpfung in vitro kultivierter Wurzeln mit verschiedenen Bodenbakterien führt in allen Fällen zu starker Wachstumshemmung.
2. Auch der Zusatz von Bakterienfiltraten zum Wurzelnährboden ruft Wachstumshemmung hervor, wodurch die Annahme einer Wirkstoffwirkung bewiesen wird.

3. Da je nach Konzentration des Filtrats Wachstumshemmung oder Förderung auftritt, bei Zusatz von Pepton zum Bakteriennährboden die Wirkung verstärkt wird und durch Erhitzen des Filtrats eine weitgehende Inaktivierung des Wirkstoffes erfolgt, wird angenommen, daß es sich vorwiegend um  $\beta$ -Indolylessigsäure handelt.

#### Literatur.

- GEIGER-HUBER, H., und H. BURLETT: Jb. Bot. 84, 233 (1936). — HILTNER, L.: Arb. Dt. Landwirtsch. Ges. 98, 59 (1904). — JANKE, A.: Zbl. Bakter. 100, 409 (1939). — KANDLER, O.: Z. f. Naturf. 5b, 203 (1950). — KATZNELSON, H., A. G. LOCHHEAD und M. J. TIMONIN: Bot. Review 14, 543 (1948). — KRASILNIKOF, N. A., und N. B. GARKINA: Mikrobiology (UdSSR.) 8, 952 (1939). — KRONBERGER, K.: Landw. Jb. f. Bayern 26, Heft 3/4 (1949). — LEWIS, K., und N. MCCOY: Bot. Gaz. 95, 316 (1933). — POSCHENRIEDER, H.: Landw. Jb. f. Bayern 26, Heft 9/10 (1949). — STILLE, B.: Arch. f. Mikrobiol. 9, 477 (1938).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität München.)

## Die Wirkung natürlicher Ultraviolettstrahlung auf die Chlorophyllzerstörung von Planktonalgen.

Von

FRITZ GESSNER und AMELY DIEHL.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. September 1950.)

Daß der sichtbare Bereich der Sonnenstrahlung auf Art und Verteilung der Pflanzen einen entscheidenden Einfluß ausübt und durch die quantitativen Abstufungen seiner Intensität Sonnen- und Schattenpflanzen erzeugt hat, gehört zu den ältesten Erkenntnissen physiologisch-ökologischer Forschung. Desgleichen ist seit langem bekannt, daß die Anpassung der Pflanzen an verschiedene Lichtquantitäten konstitutioneller sowie modifikativer Art sein kann.

Wesentlich kürzeren Datums ist die Erkenntnis, daß auch die Ultraviolettstrahlung der Sonne eine Auslesewirkung auf die Pflanzenwelt ausübt. Dies hat 3 Ursachen. Erstens ist es weit schwieriger, im kurzwelligen Bereich der Sonnenstrahlung Intensitätsmessungen durchzuführen als im sichtbaren Licht. Zweitens sind Unterschiede der UV-Intensität in der Regel mit gleichgerichteten Unterschieden der Lichtintensität gekoppelt, so daß es nicht ohne eingehende Analyse möglich ist, zu entscheiden, welchem Teil des Sonnenspektrums nun gerade die ausschlaggebende Rolle zukommt. Ökologisch ist hier nur der Vergleich der Hochgebirgsflora mit jener des Tieflandes verwertbar, da bei steigender Meereshöhe der UV-Anteil der Sonnenstrahlung viel stärker zunimmt als das sichtbare Licht. Aber auch dieser Vergleich führt noch nicht zu eindeutigen Ergebnissen, da das gesamte ökologische Milieu im Tiefland und im Gebirge denkbar verschieden ist und wir also auch hier mit einer großen Zahl von Unbekannten zu rechnen haben. Erst experimentelle Untersuchungen unter wohl definierten Bedingungen (v. WETTSTEIN u. PIRSCHLE, 1940, 1941) haben uns daher die höhere UV-Resistenz der Hochgebirgsflora erkennen lassen. Die dritte Schwierigkeit, die ökologische Bedeutung der UV-Strahlung zu erkennen, beruht darin, daß die Primärwirkungen des UV auf Zellbestandteile kaum zu analysieren sind, denn auch die morphologischen Änderungen, die z. B. BÜNNING (1947) an Tropenpflanzen bei mehrstündiger intensiver UV-Strahlung an den Zellkernen feststellen konnte, lassen ja noch keine Rückschlüsse auf die Art der Vorgänge zu, denen sie ihr Entstehen verdanken. Wir können nur feststellen, daß die UV-Wirkung — namentlich bei stärkeren Intensitäten — wohl ausnahmslos eine schädigende sein dürfte, denn alle



Erfahrungen an Gewächshauspflanzen sprechen ja dafür, daß zum normalen Gedeihen der Pflanzen zum mindest das durch das Glas abgefilterte UV nicht nötig ist.

Wenn wir das Problem der UV-Resistenz untersuchen, so bedeutet es demnach einen wesentlichen Vorteil, daß wir im Chlorophyllapparat der Pflanzen ein Organ besitzen, dessen verschiedene UV-Resistenz einen feinen Indikator für die ökologische Bedeutung der UV-Wirkung darstellt. Aus Untersuchungen von MONTFORT und ZÖLLNER (1942) wissen wir, daß der Chlorophyllapparat gegenüber der intensiven Strahlung bei einzelnen Pflanzen sehr verschiedene Grade der Widerstandsfähigkeit aufweist, und neuerdings konnte MONTFORT (1950) nachweisen, daß sowohl im Hochgebirge wie in der Tiefebene Typen konstitutioneller sowie modifikativer Anpassung vorhanden sein können.

Wenn wir aber nun Untersuchungen an höheren Pflanzen anstellen, so können wir ohne entsprechende Analyse nicht von vornherein sagen, ob die verschiedenen Grade von Chlorophyllschwund wirklich auf Verschiedenheiten in der Struktur des Chlorophyllapparates beruhen, die Resistenzunterschiede also auf Eigenschaften des Protoplasmas und der Plastiden zurückzuführen sind, oder einfach auf die verschieden stark ausgeprägte Eigenschaft der Pflanze, die schädigende UV-Strahlung von den empfindlichen Zellbestandteilen fernzuhalten. Untersuchungen von BÜNNING (1947) haben ja ergeben, daß pflanzliche Epidermen je nach dem Grade ihrer Wachseinlagerungen das UV sehr unterschiedlich absorbieren. Auch dem im Zellsaft gelösten Anthocyan kommt wegen seiner hohen UV-Absorption sicher die Bedeutung des Schutzes vor zu starker kurzwelliger Strahlung zu.

Derartige Schutzeinrichtungen fehlen nun den niederen Pflanzen wohl vollkommen, denn eine Cuticula treffen wir bekanntlich erst bei den Archeogoniaten an. Desgleichen fehlt das Anthocyan, das als UV-Schirm wirken könnte. Dagegen bliebe zu prüfen, wie weit Carotinoide als Schutz gegen kurzwellige Strahlung in Betracht kommen (vgl. S. 446). Im allgemeinen werden wir aber erwarten dürfen, daß Unterschiede in der Chlorophyllresistenz bei den Algen in viel höherem Maße als bei Phanerogamen Ausdruck von Verschiedenheiten des Chlorophyllapparates selbst sind.

Es ergibt sich somit die interessante Frage, welche Beziehungen zwischen diesen Typen und den Strahlungsbedingungen des Standortes der Algen bestehen. Diese Frage aber führt uns sofort zu einem grundlegenden Unterschied zwischen dem Land und dem Wasser als Pflanzenstandort. Seitdem im Jahre 1883 TH. W. ENGELMANN seine bekannte Theorie der chromatischen Adaptation der Meeresalgen aufgestellt hat, wurde die spektrale Verschiebung, welche die Strahlung im Wasser erleidet, ausschließlich für den sichtbaren Bereich ökologisch ausgewertet. Nun ist aber diese Verschiebung im kurzwelligen Bereich noch weit be-

trächtlicher, denn wenn z. B. die Intensität des Lichtes bei einer Wellenlänge von  $666\text{ m}\mu$  (dem roten Absorptionsmaximum des Chlorophylls) in 1 m Wassertiefe auf etwa  $\frac{1}{3}$  abgesunken ist, ist vom eingestrahnten UV bestenfalls noch  $\frac{1}{10}$  vorhanden (vgl. S. 447). In den obersten dm des Wassers werden wir also Unterschiede in der UV-Intensität antreffen, die in der Atmosphäre erst in Vertikalentfernungen von Kilometern auftreten.

Aus den verschiedenen Resistenztypen des Chlorophylls gegenüber dem UV einerseits und dem starken Gefälle der kurzwelligen Strahlung im Wasser andererseits ergibt sich das Thema der vorliegenden Arbeit, die sich zur Aufgabe gestellt hat, die Beziehungen zwischen diesen beiden aufzufinden.

Wir beschränkten uns hierbei auf Algen des Planktons, da bei diesen quantitative Chlorophyllbestimmungen leichter durchzuführen waren, obgleich wir der Meinung sind, daß festgewachsene Algen, die in verschiedener Wassertiefe siedeln, vielleicht noch feinere Abstufungen der Resistenz erkennen lassen werden. Es ist geplant, in späteren Untersuchungen auch diese Fragen aufzugreifen.

### I. Methodik.

Zur Untersuchung gelangte Phytoplanktonmaterial aus den oberbayrischen Voralpenseen in seiner natürlichen quantitativen und qualitativen Zusammensetzung. Wasserproben wurden am See in Literflaschen abgefüllt und kamen am folgenden oder spätestens zweiten Tage nach der Entnahme zur Bearbeitung. Zu diesem Zwecke wurde das Untersuchungswasser in runde Glasschalen gegossen, so daß es hier eine Schichthöhe von 1—5 cm Dicke hatte. Diese Glasschalen wurden in einer großen, wasserdurchspülten Glaswanne exponiert, so daß selbst nach vielstündiger intensiver Sonnenbestrahlung keine Erwärmung über die Anfangstemperatur erfolgte. (Die mit Glas bedeckten Schalen waren allerdings in der Regel etwa  $2^\circ$  wärmer als die unbedeckten.) Während die eine Schale frei der Sonnenstrahlung ausgesetzt war, wurde die andere zur Ausschaltung der UV-Strahlung mit einer 0,5 cm dicken und drei dünnen Glasplatten bedeckt. Die spektroskopische Prüfung der dicken Glasplatte ergab hier im Spektrum des Fe-Bogens einen Beginn der Absorption bei  $351\text{ m}\mu$ . Die letzte beobachtbare Linie lag bei  $344\text{ m}\mu$ , die erste, nicht mehr zu sehende Linie bei  $339\text{ m}\mu$ . Da hierzu noch die Absorption der drei dünnen Glasplatten kam, dürfen wir annehmen, daß von der Gesamt-UV-Strahlung des Sonnenlichtes noch eine geringe Menge des langwelligen UV vorhanden war, daß aber schon von einer Wellenlänge von etwa  $350\text{ m}\mu$  an eine praktisch vollkommene Ausschaltung erreicht werden konnte.

Um auch das langwellige UV entfernen zu können, wurde in einigen Fällen über die Schale mit dem Versuchswasser eine Glaswanne mit einer Chininsulfatlösung gelegt. Die Exposition erfolgte auf einer nach Süden liegenden Terrasse des botanischen Institutes, wohin die Sonne von 8 Uhr früh bis 17 Uhr ungehindert Zutritt hatte. Die Messung der UV-Strahlung erfolgte mit dem UV-Dosimeter, welches bekanntlich vornehmlich den kurzwelligen UV-Bereich erfaßt. Die Gesamtstrahlung wurde mit dem Robitsch-Aktinographen ermittelt, doch soll von der Wiedergabe dieser Kurven hier abgesehen werden.

Nach einer Expositionsdauer von einigen Stunden wurde der Inhalt der beiden Glasschalen gut durcheinandergerührt und jeweils die gleiche Wassermenge abgefüllt. (Da aus der Schale ohne Glasplatte inzwischen etwas Wasser verdunstet war, mußte natürlich vorher auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt werden.)

Die entnommenen Wasserproben wurden in einem Steffilter unter Druck durch ein Cellafilter gepreßt, das eine maximale Porenweite von  $1\ \mu$  hatte. Der Filterrückstand wurde in Methanol aufgelöst (Einwirkungsdauer des Methanols etwa 12–24 Std) und hernach die Lösung in die Mikroküvette des Pulfrich-Photometers abgefüllt. Die Chlorophyllbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von  $666\ m\mu$ , wie dies von GESSNER (1944) beschrieben worden ist. Eine chromatographische Trennung der einzelnen Pigmente erfolgte nicht, da hierzu das Material nicht ausgereicht hätte. Über das Verhalten der Carotinoide kann infolgedessen in dieser Arbeit nichts ausgesagt werden.

## II. Versuchsergebnisse.

### A. Die Chlorophyllzerstörung in natürlichen Phytoplanktongesellschaften.

#### 1. Kieselalpengesellschaften.

Zur Untersuchung gelangte zunächst das Wasser des „Klostersees“ bei Seon, eines kleinen, sehr eutrophen Sees, 6 km nördlich von Seebuck

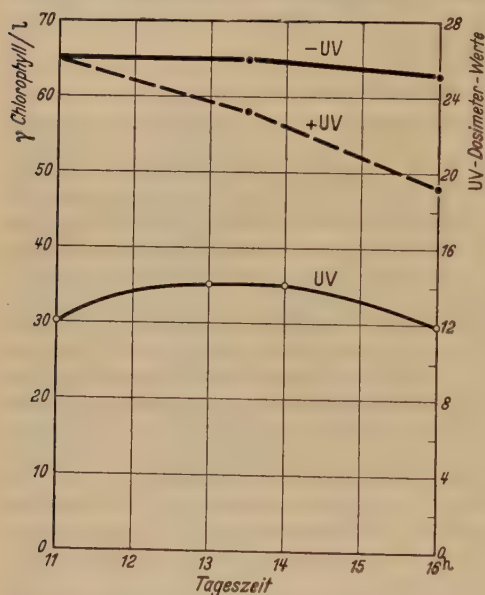


Abb. 1. Chlorophyllabnahme des Klostersee-Planktons am 12. Mai 1950. + UV = Chlorophyllgehalt in den offenen Schalen, - UV = Chlorophyllgehalt in den mit Glasplatten bedeckten Schalen. Kreise = Werte des UV-Dosimeters. Die gleichen Signaturen gelten für alle folgenden Abbildungen.

liegen, während dieser in den offenen Schalen am 12. Mai 26%, am 15. Juni 55% betrug. Die UV-Strahlung hatte also eine gewaltige Abnahme des grünen Pigmentes verursacht, und es liegt nahe, die stärkere Zerstörung des Juni-Versuchs auch auf die höhere UV-Strahlung zurückzuführen, denn diese betrug hier im Mittel 20,4 Einheiten gegenüber 13 Einheiten am 12. Mai. Es muß jedoch noch die Möglichkeit offen-

lassen. An beiden Untersuchungstagen bestand die Hauptmasse des Phytoplanktons aus *Synechococcus acus f. delicatissima*. Außerdem war noch die Blaualge *Lyngbya limnetica* zahlreich vorhanden. Quantitativ war die Planktonmenge zwischen dem 12. Mai und dem 15. Juni stark zurückgegangen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 1 und 2 wiedergegeben. Wir erkennen, daß die Wasserproben, die mit den Glasplatten bedeckt gewesen und so vor der Einwirkung der kurzwelligen UV-Strahlung weitgehend geschützt waren, praktisch keinen Chlorophyllschwund erken-

nen lassen, während dieser in den offenen Schalen am 12. Mai 26%, am 15. Juni 55% betrug. Die UV-Strahlung hatte also eine gewaltige Abnahme des grünen Pigmentes verursacht, und es liegt nahe, die stärkere Zerstörung des Juni-Versuchs auch auf die höhere UV-Strahlung zurückzuführen, denn diese betrug hier im Mittel 20,4 Einheiten gegenüber 13 Einheiten am 12. Mai. Es muß jedoch noch die Möglichkeit offen-



gelassen werden, daß die Unterschiede auch — wenigstens teilweise — auf dem verschiedenen physiologischen Zustand der Algen beruhen.

Beachtenswert ist ferner die Tatsache, daß die Chlorophyllabnahme annähernd linear mit der Bestrahlungsdauer erfolgte.

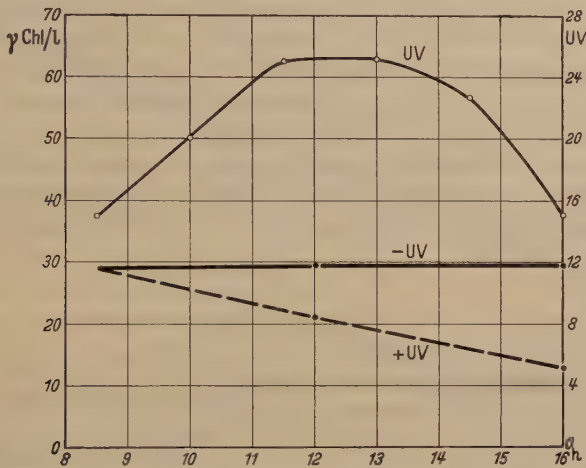


Abb. 2. Chlorophyllabnahme des Klostersee-Planktons am 15. Juni 1950.

Genau die gleichen Ergebnisse wie die aus dem Klostersee gaben die Versuche, die mit Bodenseeplankton angestellt worden sind. Die Wasserproben wurden am 3. Juni geschöpft (Lindauer Bucht) und am 4. und 5. Juni verarbeitet (Abb. 3 u. 4). Das Phytoplankton bestand zu jener Zeit in der Hauptsache aus *Cyclotella*, die ja immer die Masse des pflanzlichen Bodenseeplanktons ausmachen (vgl. GRIM, 1939). Sehr häufig

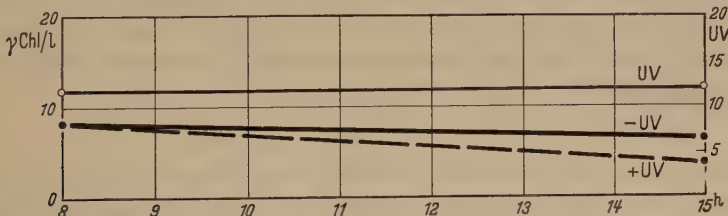


Abb. 3. Chlorophyllabnahme des Bodensee-Planktons am 4. Juni 1950.

waren außerdem noch *Fragilaria crotonensis*, *Tabellaria fenestrata*, *Asterionella formosa* und *Synedra acus f. delic.* Außer diesen Kieselalgen waren noch vertreten *Chlamydomonas spec.*, *Dinobryon sertularia*, *Sphaerocystis Schroeteri*, *Ceratium hirundinella* und *Peridinium spec.*

Die Chlorophyllabnahme war beim Bodenseeplankton noch deutlicher als bei der Schwebeflora des Klostersees. Sie betrug am 4. Juni, einem Tag mit einer mittleren UV-Intensität von 12 Einheiten 54%, am 5. Juni (UV-Mittel 19,3 Einheiten) sogar 70% bei einer Expositionsdauer von



7—8 Std. Die UV-Strahlung eines einzigen Tages hatte also genügt, um nahezu  $\frac{3}{4}$  der gesamten Chlorophyllmenge zu zerstören. Ob diese Zerstörung auch hier mit der Bestrahlungszeit linear ansteigt, konnte nicht ermittelt werden, da aus Materialmangel kein Zwischenwert genommen werden konnte. Die Abnahme des Chlorophylls unter den Glasplatten war auch beim Bodenseeplankton weit geringer als bei voller Einstrahlung, gegenüber dem Klostersee aber doch immerhin deutlich.

Ein ganz ähnliches Ergebnis brachten auch die Versuche mit dem Ammerseeplankton. Die *Kieselalgen* (*Fragilaria crotonensis*, *Synedra acus* f. *delicatissima*, *Asterionella formosa*) traten mengenmäßig allerdings hier hinter *Ceratium hirundinella* zurück. Mit der Exposition wurde um 7,45 Uhr begonnen. Sie dauerte bis 15,45 Uhr. Die mittlere UV-Intensität betrug 17,5 Einheiten.

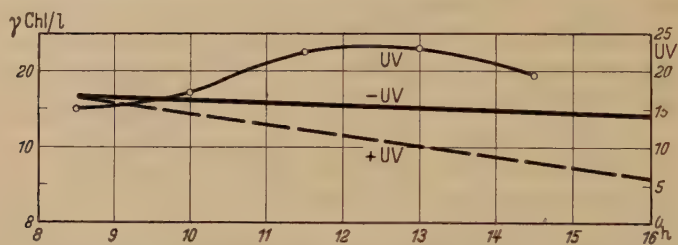


Abb. 4. Chlorophyllabnahme des Bodensee-Planktons am 5. Juni 1950.

Es ergaben sich hierbei folgende Chlorophyllwerte ( $\gamma/L$ ): Ausgangswert 11,7, Endwert mit UV 6,5, Endwert ohne UV 10,4. Der Chlorophyllschwund unter UV-Wirkung betrug hier 44,5%, während er unter den Glasfiltern nur etwa 10% ausmachte. Da die Hauptmasse — wie erwähnt — aus *Peridineen* bestand, dürfen wir also sagen, daß diese *Flagellaten* hinsichtlich der Chlorophyllzerstörung genau so empfindlich sind wie *Kieselalgen*.

## 2. Phytomonadenplankton.

Um festzustellen, ob außer *Diatomeen* und *Peridineen* auch andere Gruppen des Phytoplanktons einen gegenüber UV empfindlichen Chlorophyllapparat besitzen, wurden Wasserproben aus dem Weßlingsee herangezogen. Dies ist ein kleiner, überaus planktonreicher See bei dem Orte Weßling (Strecke München-Herrsching). Die Zusammensetzung des Phytoplanktons, das seit Jahren Gegenstand eingehender Untersuchungen ist (vgl. GESSNER, 1949), zeichnet sich dadurch aus, daß die *Kieselalgen* immer völlig zurücktreten und die Hauptmasse von *Phytomonaden*, *Flagellaten*, *Chlorophyceen* und kleinen *Cyanophyceen* gebildet wird.

Die am 7. Juni geschöpfte Wasserprobe enthielt in der Hauptsache *Phacotus Lendneri* (5000 Zellen in 1 cm<sup>3</sup>). Außerdem traten vereinzelt

noch *Coelastrum reticulatum*, *Pediastrum duplex*, *Synedra acus* f. *delicatissima* und *Tabellaria fenestrata* auf. 2 Tage später war *Phacotus* nahezu völlig verschwunden und an seine Stelle in fast gleicher Häufigkeit eine *Chlamydomonas*-Art getreten.

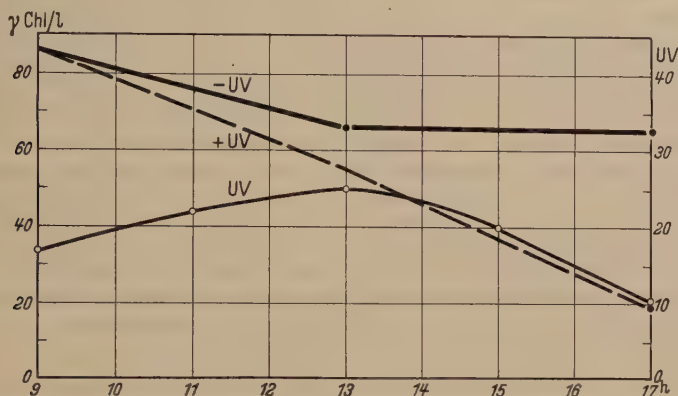


Abb. 5. Chlorophyllabnahme des Weßlingsee-Planktons (*Phacotus*) am 7. Juni 1950.

Die Abb. 5 und 6 zeigen den Chlorophyllabbau nach 8stündiger Exposition. Bei *Phacotus* beträgt er 77 %, bei *Chlamydomonas* 67 %, wobei es wiederum wahrscheinlich ist, daß dieser Unterschied seine

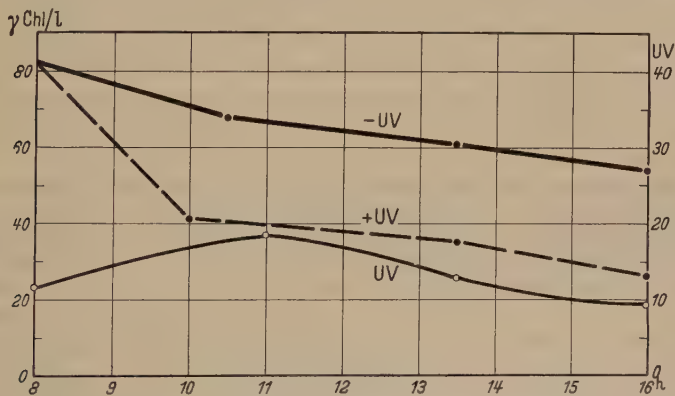


Abb. 6. Chlorophyllabnahme des Weßlingsee-Planktons (*Chlamydomonas*) am 9. Juni 1950.

Ursache in der verschiedenen UV-Strahlung hat, denn diese betrug bei *Phacotus* im Mittel 21 Einheiten, bei *Chlamydomonas* 13,3 Einheiten des Dosimeters.

Der Chlorophyllapparat der *Phytomonaden* ist also gegen das UV mindestens ebenso, wahrscheinlich aber noch empfindlicher als jener der *Kieselalgen* und *Peridineen*. Gegenüber diesen zeigen die *Phytomonaden* aber einen wesentlichen Unterschied. Während nämlich die *Kieselalgen*

und *Peridineen* unter Glas keinen nennenswerten Chlorophyllabbau erkennen lassen, ist dieser bei *Phacotus* und *Chlamydomonas* beträchtlich. Er beträgt 33 bzw. 36 %.

Da — wie wir sahen — die Glasplatten noch einen Teil des langwelligen UV durchlassen, dürfen wir bei den *Phytomonaden* wohl in diesem die Ursache für die Chlorophyllzerstörung sehen und wir dürfen weiter vermuten, daß es die braunen Pigmente sind, die den *Diatomeen* und *Peridineen* Schutz gegen diesen Strahlenbereich gewähren, kennen wir doch auch sonst Fälle (z. B. bei *Euglena sanguinea*), wo Carotinoide als Strahlenschutz wirken. Es wird freilich weiterer Untersuchungen bedürfen, um diese Vermutung zu erhärten.

Bei vergleichenden Resistenzuntersuchungen muß natürlich auch das a/b-Verhältnis der Chlorophylle berücksichtigt werden, denn nach Untersuchungen EGLES (1944) ist a weniger resistent als b. *Kieselalgen* haben bekanntlich nur a, bei *Chlamydomonas* ist das a/b-Verhältnis 5:1. Man sollte also bei diesen *Phytomonaden* eine größere Resistenz vermuten. Das Gegenteil war jedoch bei unseren Untersuchungen der Fall und zeigt uns, daß die Verschiedenheit in der Resistenz von a und b meist durch andersartige Bedingungen überlagert ist.

### B. Ökologische Beziehungen zwischen UV-Strahlung und Chlorophyllabbau.

Haben wir soeben festgestellt, daß oft ein einziger Tag intensiver Strahlung genügt, um mehr als 70% der im Phytoplankton lokalisierten Chlorophyllmenge abzubauen, so führt dies bei oberflächlicher Betrachtung zur Frage, wieso sich denn im freien Wasser längere Zeit eine so empfindliche Algengemeinschaft halten könne, übertrifft sie doch bei weitem die empfindlichsten Typen höherer Pflanzen, die wir in Höhlen oder tiefen Wasserschichten finden. Während diese an ihrem natürlichen Standort aber einer äußerst geringen Strahlung ausgesetzt sind, scheint das Phytoplankton in den oberen Wasserschichten ungeschützt unter der vollen Strahlenwirkung der Sonne zu stehen.

Hierzu ist zu sagen, daß sich die UV-Strahlung unter natürlichen Bedingungen nur selten so extrem auswirken wird, wie in unseren Experimenten. Diese wurden ja so angesetzt, daß die maximal möglichen UV-Intensitäten zur Geltung kamen. Erstens wurde im Mai, Juni und Juli gearbeitet, also zur Zeit des höchsten Sonnenstandes. Zweitens wurden vor allem klare, möglichst wolkenlose Tage mit ununterbrochener starker Strahlung zu den Versuchen gewählt. Drittens aber, und dies ist der entscheidendste Gesichtspunkt, wurde die Exposition ja in flachen Schalen bei einer Schichtdicke von wenigen Zentimetern vorgenommen, während wir im Wasser ja mit einer Schichtdicke von mehreren Metern rechnen müssen.

Würde eine Planktonalge sich während des ganzen Tages an der Wasseroberfläche aufhalten, so müßte hier der gleiche Pigmentabbau eintreten, wie in unseren Experimenten. Die epilimnische Oberflächenschicht eines Sees befindet sich aber zumeist in gewisser Turbulenz, so daß also auch die Planktonalgen kurzfristig ihren Standort wechseln. Im Klostersee z. B. besitzt während der Sommermonate das Epilimnion (d. h. die Wassermasse zwischen der Oberfläche und der oberen Grenze der Temperatursprungschicht) eine Dicke von 4—5 m. Bei ständiger Turbulenz wird also der mittlere Aufenthaltsort einer Planktonalge bei 2—2,5 m Tiefe sein. Wir müssen also die UV-Strahlung in *dieser* Tiefe unseren Betrachtungen zugrunde legen.

Die wenigen bisher durchgeführten Messungen über die UV-Durchlässigkeit in Binnengewässern lassen erkennen, daß der Absorptionskoeffizient hier im UV sehr groß ist und mit abnehmender Wellenlänge rasch ansteigt. Für den Lunzer

Untersee konnten (nach MERKER, 1931) folgende Zahlen errechnet werden (zitiert nach SAUBERER und RUTTNER, 1941):

$m\mu$ . . . . .	366	334	313	303
Durchlässigkeit pro Meter in % . . .	13,3	3,8	2,0	0,6

Im Davoser See wurde in der obersten Meterschicht mit dem UV-Dosimeter eine maximale Durchlässigkeit von 9,6% gefunden.

Danach würde also in 1 m Tiefe rund 10% der einfallenden UV-Strahlung vorhanden sein, in 2 m Tiefe nach dem LAMBERTSchen Gesetz rund 1%.

Wir erkennen somit, daß schon in geringer Wassertiefe die Intensität der UV-Strahlung so klein ist, daß sie keine Bedeutung für den Chlorophyllabbau haben dürfte. Auch wenn wir annehmen wollten, daß die minimalen täglichen Schädigungen sich summieren — eine Annahme, die durch nichts gerechtfertigt ist —, müßten wir lange Zeiträume zur Auswirkung derartiger Schädigungen annehmen. Dem widerspricht aber die Kurzlebigkeit der meisten Planktonalgen, deren Lebensdauer meist nur wenige Tage beträgt (vgl. GRIM, 1950). Nur an klaren und ganz ruhigen Tagen mag es vorkommen, daß in der Oberflächenzone eines Sees eine lebhafte Chlorophyllzerstörung einsetzt, doch diese wird dann auf die obersten dm beschränkt bleiben und insgesamt somit nicht ins Gewicht fallen. Im übrigen darf nach den neuesten Angaben MONTFORTS (1950) auch mit einer Regeneration des zerstörten Chlorophylls gerechnet werden.

Nur jene Algen, welche als Wasserblüte lange Zeit an der Oberfläche schwimmen, werden der vollen UV-Strahlung ausgesetzt sein, doch ist anzunehmen, daß diese eine hohe UV-Resistenz besitzen.

Dürfen wir also zusammenfassend sagen, daß die UV-Strahlung in tieferen Gewässern für den Pigmentabbau kaum eine Rolle spielt, so sieht unser Problem in flachen Gewässern ganz anders aus. Beträgt die Wassertiefe nur wenige dm, so müßte bei empfindlichen Typen binnen einiger Stunden bei gegebener Wetterlage ein erheblicher Chlorophyllschwund eintreten, der zum raschen Tode der Zellen führen würde. Es ist daher anzunehmen, daß in solchen Gewässern die UV-Strahlung eine Auslese resistenter Typen erzeugt hat.

Leider finden sich in der Umgebung Münchens nur wenige Gewässer, die sich für derartige Untersuchungen eignen.

Die erste Untersuchung bezieht sich auf einen etwa 2 dm tiefen Ententümpel bei Leutstetten, welcher ein aus *Cryptomonaden* und *Euglena*-Arten bestehendes Plankton besaß. Die Exposition erfolgte am 12. Juli von 12—16,30 Uhr bei einer mittleren UV-Intensität von 19,5 Einheiten. Es ergaben sich hierbei folgende Chlorophyllwerte in  $\gamma/L$ : Anfangswert 62,4, Endwert mit UV 58,5, Endwert ohne UV 61,1.

Hier ist also kein nennenswerter Chlorophyllschwund vorhanden, ein Verhalten, das also vollkommen unseren Erwartungen entspricht. Allerdings müssen wir darauf hinweisen, daß die Expositionszeit kürzer war



als in den früheren Versuchen und außerdem die Strahlung durch zeitweilige Bewölkung geschwächt war.

Der zweite Fall bezieht sich auf einen kleinen Teich in den Isaranlagen bei München, der eine mittlere Tiefe von 4—5 dm hatte. Sein Plankton bestand im wesentlichen aus *Chlamydomonas*. Am 19. Juli wurde es von 9—16 Uhr bei durchwegs sehr hoher UV-Strahlung exponiert, wobei sich der in Abb. 7 wiedergegebene Abfall zeigte. Hatte

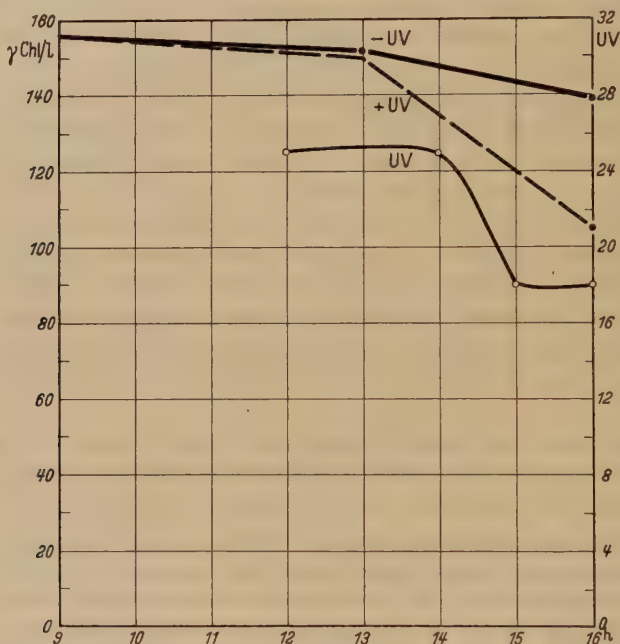


Abb. 7. Chlorophyllabnahme im Plankton (*Chlamydomonas*) eines flachen Isarteiches.

früher das *Chlamydomonas*-Material des Weßling-Sees bei 8stündiger Exposition und einer mittleren UV-Intensität von 13,3 Einheiten einen Chlorophyllschwund von 67,6% gezeigt, so zeigte das *Chlamydomonas*-Material des flachen Isarteiches bei 7stündiger Exposition und einer mittleren UV-Intensität von 21,7 Einheiten einen Abbau von 32,8%. Unzweifelhaft haben wir es hier also mit einer sehr UV-resistenten Art zu tun.

Wie bei den höheren Pflanzen gibt es also auch unter den Algen des Planktons Typen mit resistantem und mit labilem Chlorophyllapparat, wobei sich in jedem Einzelfall die Frage ergibt, ob es sich hierbei um Unterschiede konstitutioneller oder modifikativer Art handelt. Wahrscheinlich würden wir bei genauerer Analyse beide Möglichkeiten finden.

## C. Untersuchungen an Algenkulturen.

Die bisherigen Versuche waren von ökologischen Fragestellungen ausgegangen, und zwar in doppeltem Sinne, denn es wurden ja natürliche Planktongesellschaften in ihrer Beziehung zur natürlichen UV-Strahlung untersucht. Bot dieses Verfahren den Vorteil der direkten Übertragbarkeit der Befunde auf die Verhältnisse im freien Wasser, so verband sich damit der Nachteil, keine genau definierten Versuchsbedingungen zuzulassen. Es war darum wünschenswert, die bisherigen Befunde an Reinkulturen von Planktonalgen zu ergänzen.

## 1. Untersuchungen an Chlorophyceen.

Als erste Form diente *Chlorella*, die in unserem Institut seit langem zu Assimilationsuntersuchungen gezogen wird und uns von Herrn Dr. KANDLER freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Wir verwendeten zunächst eine sehr dichte Suspension und fanden die in Tab. 1 wiedergegebenen Chlorophyllwerte.

Tabelle 1. Chlorophyllgehalt einer *Chlorella*-Kultur bei UV-Exposition am 14. Juli 1950 von 8—16 Uhr.

	UV-Einheiten	Chlorophyll $\gamma/L$			
		Dichte Suspension		Suspension verd.	
		mit UV	ohne UV	mit UV	ohne UV
8 Uhr . . . . .	12,5	7125	7125	260	260
10 „ . . . . .	18				
11 „ . . . . .	25,5				
12 „ . . . . .	28	6675	6675	248	210
13 „ . . . . .	25,5				
14 „ . . . . .	22,5				
16 „ . . . . .	14	6675	6675	210	210

Wir erkennen aus den Werten unter „dichte Suspension“, daß trotz sehr starker UV-Strahlung ein Chlorophyllschwund von nur 6,4% eingetreten war, die *Chlorella* somit eine außerordentlich resistente Form zu sein scheint. Nun zeigen aber die hohen Chlorophyllwerte, daß wir mit einer sehr dichten Suspension gearbeitet haben und somit die Möglichkeit der gegenseitigen Beschattung gegeben war. Es wurde darum von der gleichen *Chlorella*-Suspension eine starke Verdünnung hergestellt und diese am gleichen Tage exponiert. Die Chlorophyllabnahme war hier stärker und betrug 19,3%. Sie war in den beiden Glasschalen mit und ohne Glasbedeckung im Endwert gleich, was darauf hindeutet, daß an der Schädigung entweder das sichtbare Licht oder die langwellige UV-Strahlung beteiligt war. Verglichen mit anderen Algen war aber *Chlorella* immer noch außerordentlich stabil, was um so erstaunlicher ist, als es sich um eine Schattenform mit einem tiefegelegenen Lichtoptimum (etwa

800 Lux) handelt. Schwachlichteinstellung und geringe UV-Resistenz brauchen also keineswegs immer parallel zu gehen.

Es war nun zu prüfen, ob diese hohe UV-Resistenz eine Eigentümlichkeit von *Chlorella* (bzw. unseres *Chlorella*-Stammes) war oder auch bei anderen planktischen *Chlorophyceen* gefunden werden kann. Es wurden darum aus Stämmen, die wir Herrn Prof. A. PIRSON verdanken, in verdünnter USPENSKY-Lösung Kulturen von *Scenedesmus quadricauda* und *Ankistrodesmus* angelegt und unter gleichen Beleuchtungsbedingungen herangezogen (Nordfenster). Eventuelle Unterschiede mußten also konstitutioneller Art sein. Abb. 8 zeigt das Ergebnis einer am 7. August erfolgten Exposition. Wir erkennen, daß sich beide Formen durch ihre

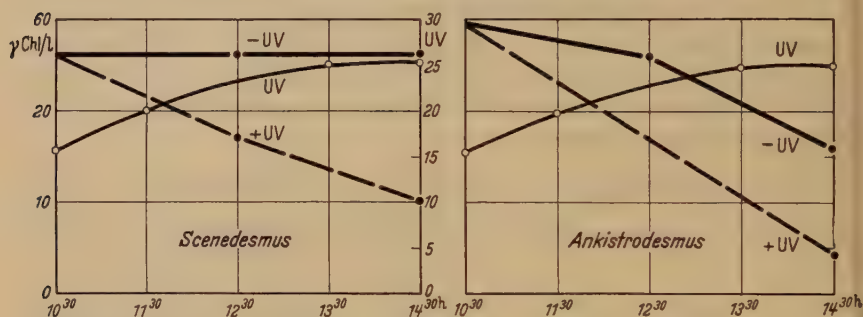


Abb. 8. Chlorophyllabnahme in Reinkulturen von *Scenedesmus* und *Ankistrodesmus* am gleichen Tage.

geringe Resistenz sehr wesentlich von *Chlorella* unterschieden, daß sie aber auch untereinander sehr verschieden waren. *Scenedesmus* war hierbei wesentlich resistenter als *Ankistrodesmus*. Ohne UV zeigte *Scenedesmus* überhaupt keine Chlorophyllabnahme, mit UV betrug sie 64%; *Ankistrodesmus* dagegen zeigte schon unter den Glasplatten einen Chlorophyllverlust von 44%, bei voller Strahlungseinwirkung dagegen einen solchen von 86%, die maximale bisher beobachtete Pigmentabnahme, die schon mit freiem Auge am Ausbleichen der Suspension erkennbar war.

Wir erkennen somit, daß sich zwei ganz nahe verwandte Formen, die unter den gleichen Bedingungen aufgezogen waren, hinsichtlich der UV-Resistenz des Chlorophyllapparates grundlegend unterscheiden können.

An *Scenedesmus* wurde auch ein Versuch angestellt, der die Frage klären sollte, wie sich in abgetöteten Zellen die UV-Resistenz verhält. Die Suspension wurde deshalb einige Minuten gekocht und nach dem Abkühlen der Sonne ausgesetzt. Schon nach 2 Std war das Chlorophyll restlos zerstört.

Der weitere Ausbau derartiger Versuche würde vielleicht die Frage klären können, wo denn eigentlich die Strahlenwirkung angreift. Grund-

sätzlich wäre ja eine Primärwirkung der Strahlen sowohl am Eiweißstroma des Chloroplasten als auch an den Chlorophyllmolekülen selbst denkbar.

## 2. Versuche mit Phytomonaden.

Aus Stämmen, die wir Herrn Dr. MOEWUS verdanken, wurden +- und —-Kulturen von *Chlamydomonas eugametos* in Volvoxnährlösung (nach USPENSKY plus Erdabkochung) angesetzt und gleichzeitig exponiert. Es ergaben sich hierbei die Werte der Tab. 2.

Tabelle 2. Chlorophyllgehalt von *Chlamydomonas eugametos*-Gameten bei UV-Exposition am 17. Juli 1950 von 9—16 Uhr.

	Chlorophyll $\mu$ /L			
	in +-Gameten		in —-Gameten	
	mit UV	ohne UV	mit UV	ohne UV
Anfangswert (9 Uhr) . . . . .	299	299	299	299
Zwischenwert (12 Uhr 30) . . . .	234	286	247	273
Endwert (16 Uhr) . . . . .	195	247	182	247
Chlorophyllabnahme in % . . . .	35	18	39	18

Die geringe Differenz in der Resistenz der +- und —-Gameten kann nicht als real angesehen werden, da sich bei einer Wiederholung des Versuchs das Verhältnis gerade umkehrte. Größenordnungsmäßig zeigt die

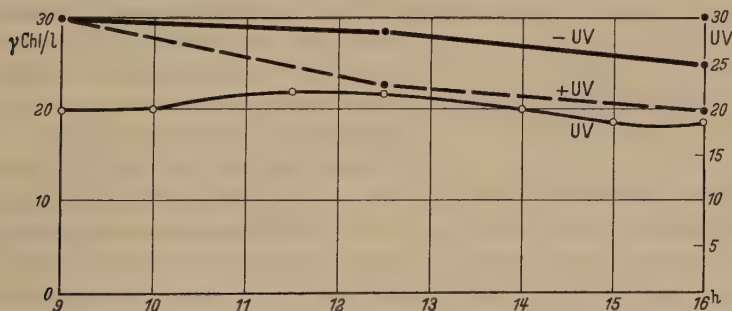


Abb. 9. Chlorophyllabnahme einer Reinkultur von +-Gameten von *Chlamydomonas eugametos*. Es wurde in diesem Falle eine dritte Schale mit einem Chininsulfatfilter überdeckt, welches die gesamte UV-Strahlung ausschaltete. Es zeigte sich hierbei keinerlei Pigmentzerstörung.

*Chlamydomonas*-Kultur den gleichen Chlorophyllschwund wie die Form aus dem Teich der Isaranlagen (vgl. S. 448). In Abb. 9 sehen wir einen Versuch, in welchem das gesamte UV durch Chininsulfat abgefiltert worden war. Die völlig gleich bleibenden Chlorophyllwerte lassen erkennen, daß der Chlorophyllschwund unter den Glasplatten auf Kosten des langwelligen UV geht.

Als besonders empfindlich gegenüber der UV-Strahlung erwies sich *Volvox globator*. Diese Form vermehrte sich 1942 im Wasserbecken des



Victoria-Hauses derart massenhaft, daß die geschöpfte Wasserprobe praktisch einer Reinkultur gleichkam. Am 1. August 1942 wurden damit Flaschen mit einem Inhalt von 60 cm<sup>3</sup> gefüllt und um 8 Uhr früh in einer wassergefüllten Wanne der Sonnenstrahlung ausgesetzt. Eine zweite Wanne mit den Vergleichsproben wurde mit einer Glasschale bedeckt, in der sich in 2 cm Schichthöhe eine 0,2% Chininsulfatlösung befand, welche den ganzen UV-Bereich abfilterte. Das Ergebnis der Bestrahlung an diesem völlig wolkenlosen Sommertag zeigt Abb. 10.

Obzwar die *Volvox*-Kulturen in Glasflaschen exponiert waren, so daß zum mindesten ein Großteil des kurzwelligen UV abgeschirmt worden war,

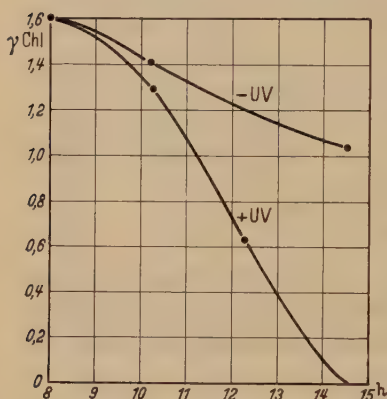


Abb. 10. Chlorophyllabnahme von *Volvox globator*. - UV bedeutet hier einen Versuch unter Chininsulfat; bei + UV waren die Kulturen in Glasflaschen exponiert worden.

wurde das Chlorophyll innerhalb weniger Stunden vollständig zersetzt. Auch das sichtbare Licht allein hatte eine zerstörende Wirkung, doch war diese weitaus schwächer.

Die hohe Empfindlichkeit von *Volvox* gegenüber dem Ultraviolett ließe erwarten, daß sich die Kugeln gegenüber zu starker UV-Intensität negativ phototaktisch verhalten. Obgleich nun *Volvox* in hohem Maße phototaktisch ist, wie seine Vertikalwanderungen in Gewässern beweisen (vgl. UTERMÖHL, 1924), läßt sich durch UV keine phototaktische Wanderung auslösen. Bedeckt man eine längliche Glaswanne zur einen Hälfte mit rotem, zur anderen mit blauem Glas, so wandern die *Volvox*-

Kugeln in weniger als 1 min bei intensiver Belichtung in das blaue Feld (vgl. GESSNER, 1943). Führt man jedoch den Versuch so durch, daß man die der direkten Sonnenstrahlung ausgesetzte Wanne zur einen Hälfte unbedeckt läßt, die andere Hälfte jedoch mit einer dicken Glasscheibe überdeckt, so vermag der *Volvox* nicht die rettende UV-freie Zone aufzusuchen.

Ob die phototaktischen Vertikalwanderungen anderer *Flagellaten*, wie wir sie oft in teichartigen Gewässern antreffen (vgl. WEIMANN, 1933) durch den UV-Gradienten gesteuert werden, müßte durch eigene Untersuchungen geklärt werden.

### Zusammenfassung.

Ziel vorliegender Arbeit war, zu untersuchen, ob das Chlorophyll von Planktonalgen durch den kurzwelligen Bereich der Sonnenstrahlung zerstört wird und ob sich zwischen den Strahlungsbedingungen am Standort und den Resistenztypen Beziehungen erkennen lassen.

Werden natürliche Algengesellschaften des Phytoplanktons in flachen Glasschalen dem Sonnenlicht ausgesetzt, so wird innerhalb eines Tages  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  des Chlorophylls zerstört. Bedeckt man die Glasschalen mit dicken Glasplatten, um das kurzwellige UV auszuschalten, so tritt entweder gar keine Chlorophyllzerstörung auf (*Diatomeen*, *Peridineen*) oder sie ist weitaus geringer als bei Einwirkung der Gesamtstrahlung (*Phytonadinen*).

Die Chlorophyllzerstörung steigt in vielen Fällen linear mit der Bestrahlungsdauer.

In tiefen Gewässern spielt die Chlorophyllzerstörung keine Rolle, da das Ultraviolett im Wasser sehr rasch absorbiert wird und in 1 m Tiefe kaum mehr 10% der eingestrahnten Intensität vorhanden ist. Die im Epilimnion meist vorhandene Turbulenz verhindert, daß sich Planktonalgen lange in den allerobersten Wasserschichten aufhalten und hier durch das UV geschädigt werden. Das Phytoplankton tiefer Gewässer wird deshalb von extrem empfindlichen Algentypen gebildet.

Planktonalgen ganz flacher Gewässer erweisen sich als viel resistenter. Hier hat die UV-Strahlung offenbar eine Auslesewirkung ausgeübt.

Reinkulturen von Algen zeigen gegenüber der natürlichen UV-Strahlung das gleiche Verhalten wie natürliche Algengesellschaften; es ergeben sich jedoch selbst bei nahe verwandten Formen große Unterschiede. So zeigt *Chlorella* einen sehr hohen, *Scenedesmus* und *Ankistrodesmus* einen sehr geringen Resistenzgrad.

+ - und - Gameten von *Chlamydomonas eugametos* zeigen keinen Unterschied in ihrer UV-Resistenz. Das sichtbare Licht allein hat hier keinerlei Wirkung. Im Gegensatz dazu wirkt bei *Volvox globator* auch das Licht ohne UV zerstörend, allerdings weit weniger als die Gesamtstrahlung.

*Volvox* ist nicht in der Lage, der schädigenden UV-Strahlung durch negative Phototaxis zu entgehen.

### Literatur.

- BÜNNING, E.: In den Wäldern Sumatras. Bonn 1947. — EGLE, K.: Botan. Archiv 45, 93 (1944). — ENGELMANN, TH. W.: Bot. Zbl. 41, Nr. 2 u. 18 (1883). — GESSNER, FR.: Die Leistungen der Pflanze (Pflanzenphysiologie). Handb. d. Biologie, Lief. 14/15. Potsdam 1943; Arch. f. Hydrobiol. 40, 687 (1944); Schweiz. Z. Hydrologie 11, 378 (1949); Ber. Bayr. Botan. Ges. 28, 180 (1950). — GRIM, J.: Internat. Rev. Hydrobiol. 39, 193 (1939). — Biol. Zbl. 69, 147 (1950). — MERKER, E.: Zool. Jb. 49 (1931). — MONTFORT, C., u. G. ZÖLLNER: Botan. Archiv 43, 393 (1948); Z. Naturforsch. 5b, 221 (1950). — PIRSCHLE, K., u. FR. v. WETTSTEIN: Biol. Zbl. 60, 626 (1940); 61, 452 (1941). — SAUBERER, F., u. F. RUTNER: Die Strahlungsverhältnisse der Binnengewässer. Probleme d. kosm. Physik XXI. Leipzig (Akad. Verlagsges.) 1941. — UTERMÖHL, H.: Tiefenwanderungen bei *Volvox*. Schrift für Süßwasser und Meereskunde. H. 9, 1 (1924). — WEIMANN, R.: Beih. z. Bot. Zbl. 51, Abt. II, 397 (1933).

## Untersuchungen über das Verhalten von *Botrytis cinerea* gegenüber Seifen und Seifenersatzstoffen.

Von

WOLFGANG R. MÜLLER-STOLL.

(Eingegangen am 6. Januar 1950.)

Im praktischen Pflanzenschutz ist es seit langem üblich, Seifenlösungen zur Bekämpfung von *Botrytis*-Befall anzuwenden; insbesondere beim Weinstock dient die Seifenspritzung allgemein zur Bekämpfung dieses Pilzes in seiner Form als Stiel- und Traubenfäule bei unreifen oder halbreifen bzw. bei reifenden Weintrauben. Die Bekämpfung mit Seife wurde lange Zeit als brauchbar angesehen, obwohl wissenschaftlich begründete Beweise für ihre fungizide Wirksamkeit niemals beigebracht worden waren. In neuerer Zeit hat man Mittel von andersartiger chemischer Zusammensetzung, aber mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften ihrer Lösungen (Erniedrigung der Oberflächenspannung, Erhöhung der Benetzungsfähigkeit der Spritzbrühen) ebenfalls als *Botrytis*-Bekämpfungsmittel empfohlen, ohne genügende Unterlagen über eine diesbezügliche Eignung gewonnen zu haben. Auf Grund neuerer praktischer Erfahrungen hat man die Wirksamkeit der Seifenmittel und ähnlicher Präparate gegen *Botrytis* als Traubenschimmel verschiedentlich angezweifelt (NIEMEYER 1936), während man gegen *Botrytis* als Stiefäule eine gewisse Wirksamkeit für möglich hält. Daher schien eine experimentelle Prüfung der Frage angebracht, zumal sich dabei Einblicke in den Stoffwechsel des Pilzes von allgemeinerer Bedeutung erwarten ließen. Bei den Versuchen war das Hauptaugenmerk auf die saprophytische und wundparasitäre Erscheinungsform des Pilzes gerichtet; dementsprechend standen Kulturversuche auf künstlichen Substraten im Vordergrund. Bekanntlich handelt es sich bei dem wichtigen Grau- oder Traubenschimmel des Weinstocks um einen Fall von Wundparasitismus, wobei der Pilz zunächst eine saprophytische Eingangsphase durchläuft, ehe er das intakte Gewebe befällt.

Durch vorausgegangene Untersuchungen war festgestellt worden (MÜLLER-STOLL 1950), daß *Botrytis* auf Nährsubstraten, denen Seifenpräparate zugegeben waren, in der Regel noch gut zu wachsen vermag; teilweise ergaben sich sogar Entwicklungsförderungen durch Seifenzusätze. Nur bei höheren Konzentrationen, die weit über jeder in der Praxis üblichen Gebrauchskonzentration lagen, waren in manchen Fällen Hemmungserscheinungen zu beobachten, die jedoch keineswegs als eigentlich fungizider Effekt angesprochen werden konnten. Bei keinem der dabei untersuchten Seifenmittel oder Ersatzpräparate wurde eine derartige Hinderung des Wachstums festgestellt, daß damit die Anwendung dieser Stoffe zur Bekämpfung von *Botrytis cinerea* als Traubenschimmel begründet werden könnte. Nach Abschluß meiner Untersuchungen ist zwischenzeitlich eine Veröffentlichung von WILHEM (1944) zur Frage der chemischen Bekämpfung der Traubenfäule erschienen, in der ebenfalls festgestellt wird, daß ein durchgreifendes Bekämpfungsmittel z. Zt. noch nicht zur Verfügung steht.

Es war nun die Frage, worauf die beobachtete günstige Wirkung von Seifenzusätzen unter bestimmten Bedingungen beruht; möglicherweise



lag eine unmittelbare Ausnutzung der Seifensubstanz als Nährstoffquelle vor. Ferner bedurfte die Natur der Hemmungswirkung bei stark erhöhter Konzentration der Seifenmittel einer Aufklärung, um vielleicht hieraus Anhaltspunkte für eine chemische Bekämpfungsmöglichkeit des Pilzes zu gewinnen.

Die Versuche zu vorliegender Arbeit wurden im Zusammenhang mit umfangreicheren Untersuchungen zur Frage der *Botrytis*-Bekämpfung in den Jahren 1937 und 1938 zuerst am Staatlichen Weinbauforschungsinstitut in Freiburg Br. und dann am Botanischen Institut der Technischen Hochschule Stuttgart durchgeführt. Das Manuskript lag bereits zu Beginn des letzten Krieges fertig vor. Da sich der Verfasser damals in Südwestafrika aufhielt und Teile seines wissenschaftlichen Materials erst jetzt zurückerlangen konnte, hat sich die Veröffentlichung verzögert.

## 1. Methode.

Für die Untersuchungen wurden 8 verschiedene technische Präparate herangezogen:

### A. Seifenmittel

1. Gewöhnliche Weinbergschmierseife, Marke „Traube“ der Seifenfabrik Köhler, Heitersheim, Müllheim (Baden).

2. Cottonölschmierseife (Handelsware).

### B. Seifenersatzpräparate

3. Altmanns flüssige Pflanzenschmierseife, Hersteller: Fa. Gebr. Altmann, Stuttgart-Zuffenhausen.

4. Adhäsit-Paste, Hersteller: Fa. C. F. Spieß & Sohn, Kleinkarlbach (Rheinpfalz).

5. Audelina, Hersteller: Fa. Otto Hinsberg, Nackenheim a. Rh.

6. Solvit, Hersteller: Fa. Gebr. Borchers, Goslar.

7. Netzmittel Urania, Hersteller: Pflanzenschutzgesellschaft m. b. H., Hamburg 36.

8. Agrotin, Hersteller: I. G. Farbenindustrie A. G., Frankfurt a. M.-Höchst.

Die Präparate 1 und 2 sind reine Kaliseifen ohne andere Begleitstoffe, wobei die Nr. 2 eine sehr reine und im Pflanzenschutz seit langem hochgeschätzte Pflanzenschmierseife darstellt. Die Mittel Nr. 3—5 enthalten ebenfalls Kaliseife, allerdings vorwiegend in der Form von Kaliumoleat, daneben teilweise auch beträchtliche Mengen Wurzelharz, wodurch eine pastenartige Beschaffenheit bewirkt wird. Die Präparate 6—8 haben in chemischer Hinsicht nichts mehr mit Seifen zu tun; sie sind flüssig, enthalten zum Teil sulfurierte Pflanzenöle als wesentliche Komponente, zum Teil sind die wirksamen Stoffe in leicht verdunstenden organischen Lösungsmitteln gelöst; im übrigen ist ihre Zusammensetzung nicht näher bekannt. Es sei festgestellt, daß die angeführten Mittel von den Herstellern nicht durchweg als gegen *Botrytis cinerea* wirksam bezeichnet worden sind. Sie wurden jedoch für die Versuche mit herangezogen, weil sie als amtlich anerkannte Netzmittel in der Praxis der Schmierseife in der Wirkung als gleichwertig oder zum mindesten als ähnlich angesehen werden. Da von den Herstellern angestrebt wird, die Ersatzmittel an Stelle von Pflanzenschmierseife in Gebrauch zu bringen, ist die Zusammensetzung der Präparate einheitlich auf eine Gebrauchskonzentration von 0,1% eingestellt, wie sie im Pflanzenschutz für Seifenlösungen allgemein als Norm gilt. Bei den verschiedenen Mitteln sind also gleiche Konzentrationen hinsichtlich der Wirksamkeit untereinander als vergleichbar anzusprechen; nur bei dem Mittel „Solvit“ ist eine 0,25%ige Lösung einer 0,1%igen Seifenlösung äquivalent. Diese Umstände sind für die Beurteilung der nachfolgenden Versuche bedeutsam.



Die Versuche wurden vorwiegend mit synthetischen Nährlösungen durchgeführt, denen die Präparate in geeigneter Konzentration zugesetzt wurden. Als Grundlage diente dabei die Nährlösung nach WÖLTJE: 75 g Saccharose, 10 g Asparagin, 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  in 1000  $\text{cm}^3$  Leitungswasser ( $\text{pH} = 4,2$ ). Je nach der Zielsetzung der einzelnen Versuche wurde die Zusammensetzung der Nährlösung in manchen Fällen abgeändert. Als Kulturgefäße dienten 150  $\text{cm}^3$ -ERLENMEYER-Kölbchen mit jeweils 25  $\text{cm}^3$  Nährlösung. Alle Angaben über Mycelgewichte beziehen sich auf eine Mycelernste aus 25  $\text{cm}^3$  Nährlösung, in der der Pilz bei 27° C im Thermostaten herangewachsen war, und zwar wurden die Versuche in der Regel nach 10-tägigem Wachstum ausgewertet. Das Myceltrockengewicht erwies sich als der beste Ausdruck für die Wachstumsleistung des Pilzes; es wurde nach Abfiltrieren der Myceldecken mit Hilfe eines Gasesiebes unter Nachwaschen mit warmem Wasser durch Trocknung auf Uhrgläsern bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz ermittelt. Um unerwünschte Ausfällungen in den Lösungen beim Erhitzen zu vermeiden, wurden die Seifen- oder Seifenersatzmittel erst den fertig abgefüllten und sterilisierten Kulturkölbchen mit Grundnährlösung zugefügt, wobei vorher die Zusatzmittel selbst als hochkonzentrierte Lösungen für sich sterilisiert worden waren.

## 2. Seifen als Nährstoffquelle für Botrytis.

Wachstumsförderungen bei *Botrytis* in seifenhaltigen Nährlösungen können dahin gedeutet werden, daß der Pilz die Zusatzstoffe bei geeigneter Konzentration als Nährstoffquelle zu verwerten vermag. Über die für *Botrytis* geeigneten Kohlen- und Stickstoffquellen besteht eine umfangreiche Literatur (vgl. ZIMMERMANN 1927), aus der hervorgeht, daß der Pilz die verschiedensten organischen Substanzen zu assimilieren vermag. Neben den gemeinhin allen saprophytischen Pilzen zugänglichen Stoffgruppen der Zucker und Aminosäuren kann *Botrytis* auch Stoffe der Carbonsäuregruppe, Proteine, Glucoside, Tannin, ja sogar Alkaloide, wie Nicotin (BEHRENS 1893) verarbeiten. Als N-Quelle sind auch anorganische Stickstoffsalze geeignet. Nach STAHEL (1911) soll *Botrytis* sogar zur Bindung atmosphärischen Stickstoffs befähigt sein.

Tabelle 1. Eignung von Stickstoffquellen für *Botrytis cinerea*. Mycelbildung (Trockengewicht in Gramm) in 25  $\text{cm}^3$  Nährlösung nach 10 Tagen bei 27° C. WÖLTJE-Nährlösung mit verschiedenen N-Quellen (1%) als Ersatz für Asparagin; 2 gleichbehandelte Parallelreihen (a und b), zugleich als Nachweis für die Genauigkeit derartiger Versuche.

Stickstoffquelle 1%	Mycel-Trockengewicht in g		
	a	b	Mittelwert
Kaliumnitrat . . . . .	0,292	0,318	0,305 ± 0,013
Ammoniumchlorid . . . . .	0,338	0,328	0,333 ± 0,005
Asparagin . . . . .	0,356	0,334	0,345 ± 0,011
Glykokoll . . . . .	0,393	0,389	0,391 ± 0,002
Glutaminsäure . . . . .	0,707	0,715	0,711 ± 0,004
Pepton . . . . .	0,420	0,439	0,430 ± 0,0095
Harnstoff . . . . .	0,014	0,012	0,013 ± 0,001

Ein Wachstumsversuch in synthetischer Nährlösung mit verschiedenen organischen und anorganischen N-Quellen (Tab. 1) ergab eine etwas schlechtere

Wirkung anorganischer N-Salze im Vergleich zu normaler WÖLTJE-Lösung mit 1% Asparagin als Stickstoffquelle. Dabei zeigte sich Ammonstickstoff in Form von Ammonchlorid gegenüber dem Nitratstickstoff in Form von  $\text{KNO}_3$  etwas überlegen. Erheblich besser als Asparagin wirkten Glykokoll, Pepton und besonders Glutaminsäure, die eine außerordentlich hohe Mycelausbeute lieferte. Harnstoff erwies sich dagegen als ungeeignet; es kam nur zur Bildung kleiner, wenige Milligramme schwerer Kümmermycelien (Tab. 1).

Tabelle 2. *Seife und Seifenersatzstoffe als C- und N-Quelle für Botrytis cinerea in zuckerarmer und zuckerfreier sowie in stickstofffreier Nährlösung (mineralische Grundnährlösung: 0,5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ); Myceltrockengewichte in Gramm nach 10 Tagen bei 27° C.*

Nährlösung	Konzentration der Zusätze	Mycelernten bei Zusatz von			Kontrollen ohne Zusatz
		gewöhnlicher Schmier- seife	„Adhäsit- paste“	„Netzmittel Urania“	
Komplette Nährlösung					
mit 7,5% Saccharose und	0,08%	0,474	0,467	0,343	0,415
0,5% $\text{KNO}_3$ . . . . .	0,15%	0,516	0,516	0,365	0,423
Grundlösung mit 0,5% Sac-	0,08%	0,034	0,038	0,035	0,036
charose und 0,5% $\text{KNO}_3$	0,15%	0,044	0,042	0,031	0,036
Grundlösung mit 0,5%	0,08%	0,004	0,004	0,002	0,0
$\text{KNO}_3$ ohne Zucker . . .	0,15%	0,009	0,007	0,004	0,0
Grundlösung mit 7,5%					
Saccharose ohne Stick-	0,08%	0,077	0,060	0,249	0,075
stoff . . . . .	0,15%	0,110	0,086	0,292	0,078

Ich versuchte festzustellen, inwieweit der Pilz seinen C- oder N-Bedarf aus Seifen- oder Seifenersatzstoffen decken kann, wenn man in synthetischer Nährlösung Zucker bzw. Stickstoffquellen ganz oder teilweise wegläßt. Als Zusatzstoffe wurden gewöhnliche Rebschmierseife, „Adhäsitpaste“ und „Netzmittel Urania“ in Konzentrationen von 0,08 und 0,15% verwendet. Die in Tab. 2 wiedergegebene Versuchsreihe zeigt in normaler vollständiger Nährlösung mit 7,5% Saccharose und 0,5%  $\text{KNO}_3$  bei Zusatz gewöhnlicher Rebschmierseife und „Adhäsitpaste“ erheblich erhöhte Erntegewichte, während bei „Netzmittel Urania“ die Mycelbildung hinter der Kontrolle zurückblieb, was sich auch bei anderen Versuchen gezeigt hatte (MÜLLER-STOLL 1950). Durch Verringerung der Saccharosegabe auf 0,5% unter Beibehaltung von 0,5%  $\text{KNO}_3$  wurden naturgemäß die Mycelerntn stark herabgesetzt, bei Zusatz von 0,15% „Adhäsitpaste“ und Rebschmierseife lagen sie jedoch immer noch um einiges höher als bei den Kontrollen. Wenn überhaupt kein Zucker mehr gegeben wurde, unterblieb im Kontrollversuch das Wachstum vollständig; in allen Kulturen mit Zusatzstoffen bildeten sich jedoch kleine Mycelien, die allerdings nur wenige Milligramme schwer wurden. Bei „Netzmittel Urania“ war das Pilzwachstum besonders

gering, bei den beiden anderen Substanzen etwas besser. Der Pilz kann demnach die Zusatzmittel als Kohlenstoffquellen verwerten. Allerdings ist bei Abwesenheit anderer C-Quellen die Assimilationsfähigkeit sehr gering, da die Mycelien nur kümmerlich gedeihen. Ist aber durch die Gegenwart einer größeren Menge einer leicht assimilierbaren C-Quelle wie Saccharose das Pilzwachstum kräftig in Gang gekommen, dann kann *Botrytis* offenbar auch die schwerer angreifbaren Zusatzpräparate besser verarbeiten. Bei normaler Zuckergabe unter Beiseitelassen einer besonderen Stickstoffquelle kann der Pilz manchen Zusatzmitteln auch etwas Stickstoff entnehmen (Tab. 2). Mit „Adhäsitpaste“ war hier das Wachstum nicht besser als in den Kontrollkulturen. Gewöhnliche Rebschmierseife zeigte jedoch bei einer Konzentration von 0,15% eine Erhöhung der Mycelausbeute um einige Milligramme; „Netzmittel Urania“ war in Abwesenheit einer anderen N-Quelle sogar ein recht guter N-Lieferant, obwohl es in Kulturen mit vollständiger Nährlösung keine Wachstumsförderung hervorzurufen vermochte.

Tabelle 3. Wachstum von *Botrytis cinerea* in Nährlösung mit gestaffelten Zuckermengen bei Zusatz von gewöhnlicher Rebschmierseife und „Adhäsitpaste“. Grundnährlösung: 1 g  $KNO_3$ , 0,5 g  $KH_2PO_4$ , 0,25 g  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 100 cm<sup>3</sup> Leitungswasser. Myceltrockengewichte (g) nach 15 Tagen bei 27° C.

Mittelzusätze		Mycelernten bei Saccharose-Gaben von				
		7,0%	3,0%	1,0%	0,5%	0,0%
Gewöhnliche Rebschmierseife . . .	0,5%	0,386	0,196	0,092	0,068	0,015
	1,0%	0,503	0,272	0,134	0,085	0,023
„Adhäsitpaste“ . . .	0,5%	0,358	0,173	0,054	0,036	0,009
	1,0%	0,507	0,269	0,078	0,046	0,008
ohne Zusatz . . .		0,336	0,155	0,050	0,029	0,000

Eine weitere Versuchsreihe sollte zeigen, wie sich bei gestaffelter Zuckermenge von 7, 3, 1, 0,5 und 0,0% Saccharose Zusätze von 0,5 und 1,0% gewöhnlicher Schmierseife und „Adhäsitpaste“ auswirkten (Tab. 3); die Konzentration der Zusatzstoffe war hier also höher als im vorigen Versuch. In allen Zuckerkonzentrationen war das Mycelwachstum bei Gegenwart eines Zusatzmittels erheblich besser als in den Kontrollen; in manchen Fällen wurde sogar über das Doppelte an Erntegewicht erzielt, so bei 1% Saccharose und 1% gewöhnlicher Schmierseife. Wiederum wurden bei gänzlicher Abwesenheit von Zucker nur ganz kleine Mycelien gebildet, während im entsprechenden Kontrollversuch jedes Wachstum unterblieb. Man könnte sich vorstellen, daß der Pilz zu Beginn des Wachstums in erster Linie auf den leicht assimilierbaren Zuckergehalt angewiesen ist und die Zusatzmittel erst in nennenswertem Umfang



verwertet werden, wenn die Mycelien bereits eine gewisse Größe erreicht haben. Bei Gegenwart größerer Zuckermengen wird mehr Mycel erzeugt, bevor ein Zurückgreifen auf andere C-Quellen notwendig wird. Eine größere Mycelmenge vermag aber im gleichen Zeitraum mehr Seifensubstanz zu verarbeiten als eine kleine. Dadurch ist offenbar bei hohen Zuckergaben die Ausnutzung der Zusatzstoffe erheblich besser und kann über 250 mg Mehrleistung an Trockengewicht ausmachen, die dem Nährstoffwert der Präparate zu verdanken ist, während das bei geringerer Zuckergabe gebildete kleinere und wohl auch physiologisch schwächere Mycel nicht so leistungsfähig ist, obwohl dieselben Zusatzmengen zur Verfügung stehen. Ganz gering war die Ausnutzung von Schmierseife und „Adhäsitpaste“ bei gänzlichem Fehlen von Zucker, da hier bereits die Keimmycelien auf diese Stoffe als einzige C-Quelle angewiesen waren und daher nur sehr langsam heranwuchsen. Von den beiden in diesem Versuch benutzten Konzentrationen der Mittelzusätze ergab jeweils die höhere (1,0 %) den besseren Erfolg im Hinblick auf Steigerung der Mycelgewichte; bei größeren Zuckergaben machte hierbei der Mehrertrag etwa 80 bis 150 mg aus, ein Beweis dafür, daß es sich tatsächlich um eine Ausnutzung der Seifenmittel als Nährstoffquellen handelt. Dabei erwies sich gewöhnliche Rebschmierseife gegenüber „Adhäsitpaste“ fast in allen Versuchen überlegen. Auch in zuckerfreier Nährlösung war trotz des an sich geringen Pilzwachstums ein Ausschlag zugunsten der gewöhnlichen Rebschmierseife festzustellen.

Nach RALPH SMITH (1902) sind Fette, wie Leinöl und Baumwollöl, gute Kohlenstoffquellen für *Botrytis cinerea*. PELTIER (1912) beobachtete in 2 % iger Ricinusölemulsion noch Wachstum des Pilzes. Vermutlich werden dabei neben der Glycerinkomponente auch die Fettsäuren angegriffen. Ich habe festzustellen versucht, wie die wichtigsten, als Bestandteile technischer Seifen in Betracht kommenden reinen Fettsäuren sich gegenüber *Botrytis* verhalten, zumal gelegentlich vermutet wird, daß der Fettsäurerest der Seifenpräparate fungizide Wirkung gegenüber dem Grauschimmel besitzt. Ich benutzte chemisch reine Stearinsäure, Palmitinsäure und Ölsäure. Da die beiden erstgenannten Stoffe feste, in Wasser unlösliche Substanzen darstellen und auch Ölsäure nicht mit Wasser mischbar ist, wurden alle Präparate als 50 % ige Emulsionen angewandt. Als Emulgierungsmittel diente das Präparat „Emulphor“, das zum Emulgieren wasserunlöslicher Substanzen in der Technik viel gebraucht wird. Die Fettsäureemulsionen wurden in 4- und 8 % iger Konzentration (bezogen auf reine Fettsäure) 5 % iger Malzextraktlösung oder WÖLTJE-Lösung zugesetzt. Es entstand eine milchige Flüssigkeit; bei Sterilisation im Dampftopf wurden jedoch Teile der Stoffe in mehr oder weniger groben Flocken ausgefällt oder schieden sich bei Ölsäureemulsion als Schicht an der Oberfläche der Flüssigkeit ab. Daher mußte eine



Sterilisation der Kulturlösungen nach Zugabe der Emulsionen vermieden werden. Als Kontrolle dienten neben Nährlösung ohne Zusätze auch Kulturen mit 4- und 8%iger „Emulphor“-Beimischung, um den Einfluß des reinen Emulgierungsmittels kennenzulernen.

In allen Kulturen fand gute Pilzentwicklung statt. Reines „Emulphor“ erwies sich gegenüber *Botrytis* als indifferent und verursachte weder eine deutliche Hemmung noch eine Förderung der Mycelernte. Dagegen bewirkten Palmitin- und Stearinsäure als 4%ige Zusätze zu WÖLTJE-Lösung eine Erhöhung der Mycelgewichte auf 0,611 g, bzw. 0,686 g gegenüber 0,537 g bei der Kontrolle. Bei 8% Palmitin- und Stearinsäure wurden 0,468 g bzw. 0,512 g gefunden, was nur einer geringfügigen Senkung der Erntegewichte unter den Kontrollwert entspricht. Ein entsprechendes Ergebnis lieferten auch Kulturen mit Malzextraktlösung; hier war bei Stearinsäure die Förderung des Pilzwachstums etwas größer als bei Palmitinsäure, bzw. die Entwicklungshemmung bei höherem Substanzzusatz etwas geringer. Bei Ölsäureemulsion wuchs der Pilz ebenfalls gut, erreichte jedoch mit 0,526 g (4%ig) und 0,417 g (8%ig) nicht die Erntegewichte der übrigen Stoffe. In manchen Kulturen war mitunter die Keimung der zur Impfung benutzten Conidien schlecht; wurden jedoch kleine Impfmycelien eingesetzt, so war das Pilzwachstum stets lebhaft. Möglicherweise beeinflussen die Fettsäuren die Keimung der Conidien bzw. die jungen Keimmycelien ungünstig; hatten jedoch die Mycelien einmal eine gewisse Größe erreicht, so war in kurzer Zeit die ganze Kultur überwachsen. Selbst bei Zugabe reiner, nicht emulgierter Ölsäure, die als dünne Schicht auf der Nährlösung schwamm, war noch Pilzentwicklung möglich, die allerdings infolge des Luftabschlusses durch den oberflächlichen Ölsäurefilm sehr verlangsamt wurde. Allmählich bildeten sich jedoch am Glasrand der Kulturen kleine Mycelien, die mit der Zeit in Form eines dichten Filzes die ganze Flüssigkeit überwachsen und wohl auch die Ölsäure angriffen. Somit ist erwiesen, daß auch die als Bestandteile von Seifenmitteln in Betracht kommenden reinen Fettsäuren selbst in hohen Konzentrationen keine praktisch belangvolle fungizide Wirkung gegenüber *Botrytis* besitzen. Trotz ihrer mangelnden Wasserlöslichkeit können die Substanzen auch als Nährstoffquellen dienen; die Aufnahme in die Pilzzelle muß durch ihre Lipoidlöslichkeit bedingt sein, wie bereits SCHMIDT (1934) für Ölsäure vermutet hat.

Was für die reinen hochmolekularen Fettsäuren gilt, kann sinngemäß auch für ihre Alkalisalze angenommen werden. Aus den vorhergegangenen Darlegungen ist daher zu schließen, daß es der Fettsäurerest der im Pflanzenschutz benutzten technischen Seifen und verwandter Präparate ist, der durch den Pilz als Nährstoffquelle abgebaut werden kann. Um dies zu erhärten, habe ich einen Versuch mit reinem Kaliumoleat durchgeführt, das mir von der Herstellerfirma der „Adhäsitpaste“ freundlichst

zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Kaliumoleat bildet eine Komponente der „Adhäsitpaste“, die außerdem in der Hauptsache noch Wurzelharz enthält. Zum Vergleich diente eine Versuchsserie mit fertiger „Adhäsitpaste“. Die in Tab. 4 wiedergegebenen Erntegewichte lagen sowohl bei Kaliumoleat als auch bei „Adhäsitpaste“ in allen Konzentrationen über dem Kontrollwert; sie lagen um so höher, je mehr Zusatzmittel der Nährlösung beigegeben war. Bei 2% Kaliumoleat-Zusatz betrug die Steigerung 290 mg gegenüber 115 mg bei der gleichen Menge „Adhäsitpaste“. Durchweg waren die Werte bei „Adhäsitpaste“ niedriger als bei reiner Ölseife. Dabei ist zu beachten, daß die „Adhäsit“-Kulturen jeweils nur etwa die halbe Menge Kaliumoleat enthielten wie die entsprechenden Ölseifenkulturen. Der ungefähr die halbe Gewichtsmenge ausmachende Harzgehalt der „Adhäsitpaste“ scheint ohne Einfluß auf den Pilz zu sein und wird, wenn überhaupt, nur in ganz geringem Maße abgebaut. Auch bei den Harzseifenpräparaten ist es also der Gehalt an Ölsäure, den der *Botrytis*-Pilz als Nährstoffquelle benutzen kann. Es bestehen somit grundsätzlich die gleichen Verhältnisse wie bei den allein aus fettsaurem Kalium bestehenden gewöhnlichen Schmierseifenmitteln.

Tabelle 4. Wirkung von reinem Kaliumoleat und dem entsprechenden Harzseifenpräparat („Adhäsitpaste“) in verschiedenen Konzentrationen als Zusätze zu WÖLTJELösung auf das Wachstum von *Botrytis cinerea*; Myceltrockengewichte in Gramm nach 10 Tagen bei 27° C.

Konzentration der Zusätze	Mycelernten bei Zusatz von	
	Kaliumoleat	„Adhäsitpaste“
0,1%	0,490	0,470
0,5%	0,500	0,493
1,0%	0,723	0,570
2,0%	0,780	0,585
Kontrolle ohne Zusatz . . .	0,466	0,472

In Lösungen mit Zusätzen von Schmierseifen und anderen seifenhaltigen Mitteln herangewachsene *Botrytis*-Hyphen enthalten stets mehr oder weniger reichlich mit Sudan III färbbare Fetteinschlüsse, meist in Gestalt größerer und kleinerer zusammenfließender Ölkugeln. Bereits bei in Seifenlösungen gebrachten Conidien und ganz jungen Keimhyphen werden die charakteristischen, von SCHMIDT (1924) ausführlich beschriebenen Fett-Tropfen sichtbar. Bei starker Fettführung wächst der Pilz im allgemeinen langsamer als in weniger verfettetem Zustand, doch wird, wenn ausreichend Nährstoffe zur Verfügung stehen, das Wachstum nicht unterbunden. SCHMIDT erblickt in der Fettanreicherung eine Art Erkrankung der Pilzzellen (pathologische Verfettung), die den Organismus so stark schwächen soll, daß er seine pathogenen Eigenschaften ver-

liert. Es bleibt zu prüfen, ob diese Ansicht für die Traubenstielfäule und andere rein parasitäre Erscheinungsformen des Pilzes zutreffend ist. Bei der in der Hauptsache auf Wundparasitismus beruhenden eigentlichen Traubenfäule verursacht die Fettspeicherung jedoch normalerweise keine Verminderung der Vitalität und Agressivität des Pilzes. Wohl ist es wahrscheinlich, daß bei schlechten Ernährungsbedingungen Keimhyphen und kleine Mycelien unter Verfettung der Zellen in gewissem Umfang in der Entwicklung gehemmt werden, doch ist diese Erscheinung zu unbedeutend, um als Grundlage für eine Bekämpfungsmethode dienen zu können. Ich möchte annehmen, daß der Fett- bzw. Ölsäureanteil der Seifen leicht in die Zellen aufgenommen wird, ohne zunächst erhebliche chemische Umwandlungen zu erfahren. Die aufgenommene Substanz wird in Form von Ölkugeln gespeichert, um offenbar erst später weiter abgebaut zu werden. Der Abbau der Fettsäuren scheint dem Pilz insofern nicht leicht zu fallen, als er dazu, wie oben gezeigt wurde, einer günstigen Ernährungslage bedarf, insbesondere muß eine leicht assimilierbare C-Quelle zur Verfügung stehen. Diese Auffassung wird dadurch gestützt, daß unabhängig vom Seifengehalt des Substrates die Fettspeicherung in schwachen Mycelien stets viel stärker ist als in lebhaft wachsenden, kräftig ernährten Hyphen. Wie schon SCHMIDT (1924) erwähnt, verschwinden die Ölvakuolen, sobald die Pilzzellen aus Seifenlösung in Pflaumendekokt übertragen werden. Die Verlangsamung des Mycelwachstums bei Verfettung ist demnach eine vorübergehende Erscheinung und zeigt nur scheinbar den Charakter einer Zelldegeneration. Derartige Mycelien bleiben weitgehend infektionstüchtig und können, sobald geeignete Bedingungen eintreten, lebhaft zu wachsen beginnen. Neuerdings hat H. v. WITSCH (1949) ganz entsprechende Feststellungen für die Verfettungserscheinungen bei *Chlorella*-Zellen gemacht; auch hier ist die Verfettung innerhalb weiter Grenzen als Reservestoffspeicherung zu betrachten, wobei die Alge potentiell ihre Vermehrungsfähigkeit behält und demnach keineswegs dauernd in ihrem Wachstumsvermögen beeinträchtigt ist.

### 3. Einfluß der Reaktionsverhältnisse auf das Wachstum von *Botrytis cinerea*.

Bei vergleichenden Wachstumsversuchen mit *Botrytis cinerea* unter Zugabe der verschiedenen Mittel in gestaffelten Mengen lag die obere Grenze für das Pilzwachstum beim gleichen Präparat oft bei sehr verschiedener Konzentration je nach der Grundnährlösung (MÜLLER-STOLL 1950); ähnliches war auch bei Versuchen mit festen Nährböden festzustellen. Es lag der Gedanke nahe, daß dies mit den Reaktionsverhältnissen der einzelnen Substrate im Zusammenhang steht, denn WÖLTJE-Lösung mit einem pH-Wert von 4,2 wird einer Reaktionsverschiebung



durch die Zusatzmittel weit mehr Widerstand entgegensetzen, als die nur wenig gepufferte, schwach saure Malzextraktlösung mit einer Eigenreaktion von  $p_H = 5,5$ . Die Seifen- und Seifenersatzmittel besitzen meist alkalische Reaktion. Es war daher von Interesse zu wissen, wo die Wachstumsgrenze von *Botrytis* im alkalischen Bereich liegt und welche  $p_H$ -Werte sich bei Mischung der einzelnen Zusatzmittel mit den benutzten Nährlösungen ergeben.

Nach WEBB (1919) liegt das Optimum für die Conidienkeimung von *Botrytis* je nach Art des Keimmediums etwa zwischen  $p_H = 2,4$  und  $4,0$ , das Minimum etwa bei  $p_H = 2,0$ ; das Maximum schwankt stark mit der chemischen Beschaffenheit des Substrates und bewegt sich etwa zwischen  $p_H = 7,0$  und  $10,0$ . Aus den Angaben von PRATT (1924) geht hervor, daß ähnliche  $p_H$ -Werte auch für das Mycelwachstum von *Botrytis* gelten. Ebenso kennzeichnet die Mitteilung von BOYLE (1924) die große Verträglichkeit von *Botrytis* gegen extreme  $p_H$ -Werte, vor allem in natürlichen Nährlösungen wie Äpfel- oder Kartoffeldekot.

Um das Wachstum von *Botrytis* im alkalischen Gebiet genauer festzustellen, benutzte ich eine der WÖLTJE-Lösung ähnliche Nährlösung von folgender Zusammensetzung: 150 g Saccharose, 5,0 g  $K_2HPO_4$ , 6,0 g  $KNO_3$ , 3,0 g  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  auf 500 cm<sup>3</sup> Wasser; diese Lösung mit einer Eigenreaktion von  $p_H = 7,6$  wurde mit Glykokoll-Natronlauge-Pufferlösung nach SÖRENSEN im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Dadurch konnten verschiedene  $p_H$ -Stufen zwischen 7,5 und 10,2 eingestellt werden (Tab. 5). Im Rahmen dieses Versuches habe ich neben *Botrytis* auch eine von Weintrauben isolierte *Penicillium*-Art auf ihr Verhalten in stark alkalischer Nährlösung geprüft. Der Versuch wurde in 2 Parallelserien durchgeführt, einmal mit ruhenden, nicht ausgekeimten Conidien als Impfmateriel, daneben durch Impfen mit kleinen Mycelflöckchen, die 48 Std auf gewöhnlicher WÖLTJE-Lösung vorkultiviert waren.

Tabelle 5. Wachstum von *Botrytis cinerea* und *Penicillium spec.* in alkalisch gepufferter Nährlösung, Standardpufferlösung: 7,505 g Glykokoll und 5,85 g NaCl im Liter; Grundnährlösung (siehe Text) mit Glykokoll-Natronlauge-Puffer im Verhältnis 1 : 1 gemischt,  $p_H$ -Werte elektrometrisch gemessen. Myceltrockengewichte in Gramm nach 10 Tagen bei 27° C.

$p_H$ -Wert	Mischungsverhältnis Glykokolllösung : 0,1 n Natronlauge	Mycelernten			
		Conidienimpfung		Mycelimpfung	
		<i>Botrytis</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Penicillium</i>
7,5	10 : 0	0,198	0,493	0,142	0,403
7,8	9,75 : 0,25	0,133	0,444	0,011	0,280
8,4	9,5 : 0,5	0,128	0,447	0,0	0,245
8,9	9,2 : 0,8	0,030	0,321	0,0	0,215
9,4	8,0 : 2,0	0,0	0,259	0,0	0,211
9,8	6,8 : 3,2	0,0	0,236	0,0	0,160
10,2	5,8 : 4,2	0,0	0,150	0,0	0,0



Beide Pilze, *Botrytis* und *Penicillium*, ergaben erwartungsgemäß die höchsten Mycelernten bei der schwächsten alkalischen Reaktion ( $p_H = 7,5$ ). Eine Ausdehnung des Versuches bis in das saure Gebiet war für die hier behandelte Frage nicht notwendig; natürlich wäre bei saurer Reaktion das Pilzwachstum noch besser gewesen. Beide Pilzarten wuchsen nach Mycelimpfung erheblich schlechter als nach Conidienimpfung. Dies ist wohl durch die größere Empfindlichkeit von Mycelien gegenüber einem Wechsel der Wachstumsbedingungen zu erklären, die bei Übertragung in alkalisch gepufferte Nährmedien stark verschlechtert wurden, während die erst in den Versuchslösungen aus Conidien hervorgegangenen Keimmycelien sich besser den Verhältnissen anpassen konnten und daher eine geringere Empfindlichkeit gegenüber hoher Alkalität erkennen ließen. Mit zunehmender Alkalität nahmen in allen Versuchsserien die Erntegewichte mehr oder weniger rasch ab (Tab. 5). Nach Mycelimpfung fand bei  $p_H = 8,4$  kein *Botrytis*-Wachstum mehr statt; nach Conidienimpfung war dagegen bei  $p_H = 8,9$  noch ganz schwache Entwicklung möglich, während bei  $p_H = 9,4$  auch hier das Wachstum aufhörte. Unter Ernährungsverhältnissen, die der benutzten synthetischen Nährlösung etwa entsprechen, können wir als Reaktionsgrenze für *Botrytis* im alkalischen Bereich ungefähr die  $p_H$ -Zahl 8,5 annehmen. Je nach Art und Zustand des Impfmateri als lag die Wachstumsgrenze etwas unter oder über diesem Wert, so daß dadurch gewisse kleine Schwankungen entstanden. Aus den Angaben der Literatur geht hervor, daß sich das Reaktions-Maximum mit den Ernährungsbedingungen ziemlich ändern kann; vor allem dürfte es in natürlichen Fruchtsäften noch mehr nach der alkalischen Seite hin verschoben sein. Im Vergleich mit *Botrytis* erwies sich *Penicillium* in alkalischen Nährlösungen weit überlegen. Dieser Organismus erreichte unter den gleichen Bedingungen wesentlich höhere Mycelgewichte und war gegen extreme Alkalität noch weniger empfindlich. Nach Conidienimpfung bildete der Pilz noch in der höchsten  $p_H$ -Stufe von 10,2 ein Mycel von 150 mg Trockengewicht; bei Mycelimpfung fand dagegen in dieser  $p_H$ -Stufe kein Wachstum mehr statt, es schloß vielmehr mit der  $p_H$ -Stufe 9,8 ab.

Während des Wachstums bildet *Botrytis* viel Säure. Daher wurden die  $p_H$ -Werte in allen Kulturen, in denen Mycelien zur Entwicklung kamen, bis auf 3,9—3,4 verschoben, und zwar ohne Rücksicht auf die Stärke des Pilzwachstums und die Ausgangsreaktion der Nährlösung. Soweit das Pilzwachstum ausblieb, erfuhr auch der  $p_H$ -Wert der Lösungen keine Veränderung. Im Hinblick auf die Säurebildung verhielt sich *Penicillium* ziemlich ebenso wie *Botrytis*. Die Säureausscheidung ist so stark, daß auch kräftig gepufferte Nährsubstrate einer Reaktionsverschiebung nicht widerstehen können. Die unter weniger günstigen  $p_H$ -Verhältnissen entstehenden Keimmycelien bilden offenbar schon sehr bald Säure, so

daß die Wachstumsbedingungen für den Pilz mit der allmählichen Verschiebung der Reaktion nach der sauren Seite hin sehr rasch besser werden. Die mit zunehmender Alkalität immer geringer werdenden Mycelernten in dem eben besprochenen Versuch (Tab. 5) sind wohl in der Hauptsache eine Folge der stufenweise immer mehr verzögerten Neutralisation der schädlichen OH-Ionen durch die Säureausscheidung des Pilzes. Es ist anzunehmen, daß bei lange genug fortgesetzter Kultur in allen Lösungen, in denen es einem Keimmycelium gelungen ist, die anfänglich ungünstigen  $p_H$ -Verhältnisse zu überwinden, nach Reaktionsverschiebung schließlich etwa die gleiche Menge Mycelsubstanz entstanden wäre. Der Pilz besitzt also die Fähigkeit, die ihm besonders günstigen Reaktionsbedingungen durch Säureproduktion selbst zu schaffen, sobald nur die Bildung eines lebensfähigen Keimmyceliums möglich ist<sup>1</sup>. Die im vorliegenden Versuch mit stark alkalischen Nährlösungen nach 10-tägigem Wachstum beobachteten  $p_H$ -Werte kommen den optimalen Reaktionsansprüchen des Pilzes sehr nahe. Der in allen Substraten im Laufe der Entwicklung von *Botrytis* ziemlich rasch zunehmende Säuregehalt war erst in alternenden Kulturen wieder geringer, indem sich mit einsetzender Autolyse die Reaktion wieder langsam dem Neutralpunkt nähert (vgl. COLIN 1909).

Daß die bei Seifenzusätzen beobachteten Wachstumshemmungen in *Botrytis*-Kulturen lediglich auf einer  $p_H$ -Wirkung beruhen, zeigte ein vergleichender Versuch mit normaler Nährlösung nach WÖLTJE und solcher, die statt primärem Kaliumphosphat ( $KH_2PO_4$ ) das sekundäre Salz  $K_2HPO_4$  enthielt. Beiden Lösungen wurde gewöhnliche Weinbergschmierseife und „Adhäsitpaste“ in verschiedener Konzentration zugesetzt. Die normale WÖLTJE-Lösung mit primärem Phosphat besitzt ohne Zusätze einen  $p_H$ -Wert von 4,2; nach Zugabe von Seife stieg die Reaktion auf  $p_H = 6,2-7,3$  je nach Menge, bei „Adhäsitpaste“ auf  $p_H = 5,4-7,1$ . In der Lösung mit sekundärem Phosphat und einer Ausgangsreaktion von  $p_H = 7,6$  entstanden nach Seifen- bzw. „Adhäsit“-Zusatz  $p_H$ -Werte von 8,7—9,5 bzw. 7,8—9,0. Das Ergebnis war sehr eindeutig (Tab. 6); ungeachtet des jeweiligen Gehaltes an Zusatzstoffen unterblieb das Wachstum überall dort, wo die Reaktion über  $p_H = 8,5$  lag. Wenn infolge teilweiser Neutralisation der Alkalität der Zusatzmittel durch Bestandteile der Nährlösung die Reaktion unter diesem Wert blieb, konnte sich der Pilz entwickeln. Die saure Grundnährlösung A mit primärem Phosphat (Tab. 6) bewirkte eine so starke Neutralisation der

<sup>1</sup> Unter extremen Bedingungen nahe der Reaktionsgrenze kann das Ernteergebnis starken Schwankungen unterliegen, da die Bildung eines genügend kräftigen Anfangsmycels von schwer kontrollierbaren Umständen abhängt. So fand ich beispielsweise in gleich behandelten Parallelkulturen mit 1% Rebschmierseife in 5 prozentiger Malzextraktlösung ( $p_H$  8,1) Erntegewichte von 0,076 g und 0,319 g.

Tabelle 6. Wachstum von *Botrytis cinerea* in Grundnährlösungen von verschiedener Ausgangsreaktion nach Zusatz von 0,1, 0,5 und 1,0% gewöhnlicher Rebschmierseife bzw. „Adhäsitpaste“. Grundlösung A: normale WÖLTJE-Lösung (siehe S. 456),  $p_H=4,2$ ; Grundlösung B: dieselbe Lösung mit 0,5%  $K_2HPO_4$  statt 0,5%  $KH_2PO_4$ . Myceltrockengewichte in Gramm nach 10 tägigem Wachstum bei 27° C.

	Konzentration der Zusätze	gewöhnliche Schmierseife			„Adhäsitpaste“		
		Mycelernte g	$p_H$ -Wert		Mycelernte g	$p_H$ -Wert	
		bei Versuchsbeginn	bei Versuchsabschl.		bei Versuchsbeginn	bei Versuchsabschl.	
Grundnährlösung A	0,1%	0,548	6,2	3,7	0,534	5,4	3,8
	0,5%	0,658	6,8	4,0	0,607	6,5	3,7
	1,0%	0,751	7,4	3,9	0,662	7,1	3,8
	Kontrolle ohne Zusatz . . . . .	0,559	4,2	3,7	0,527	4,2	3,6
Grundnährlösung B	0,1%	0,011	8,4	6,3	0,411	7,8	3,9
	0,5%	0,0	9,1	9,0	0,335	8,1	5,3
	1,0%	0,0	9,5	9,4	0,0	9,0	9,0
	Kontrolle ohne Zusatz . . . . .	0,455	7,6	3,5	0,44	17,6	3,6

Seifenbeigaben, daß der  $p_H$ -Wert aller Kulturlösungen im schwach sauren oder neutralen Gebiet lag. Bei der an sich alkalisch reagierenden Grundlösung B mit sekundärem Phosphat lagen dagegen bei den gleichen Mittelzusätzen alle  $p_H$ -Werte weit im alkalischen Bereich. Mit 0,1% Schmierseifenzusatz entstand ein  $p_H$ -Wert von 8,4; hier kam es gerade noch zur Bildung ganz kleiner Mycelflöckchen (Trockengewicht 11 mg). Bei höheren Schmierseifenkonzentrationen unterblieb das Wachstum, denn die Reaktion lag über  $p_H = 9,0$ . Bei entsprechenden Mittelzusätzen zu Grundlösung A war dagegen die Pilzentwicklung sehr üppig; als Ausgangsreaktion zu Beginn des Versuches wurde hier  $p_H = 6,8$  und 7,4 gemessen. Bei „Adhäsit“-Zusatz zu Lösung B entstanden in den beiden niederen Konzentrationen von 0,1 und 0,5%  $p_H$ -Werte von 7,8 und 8,1, die noch gutes Wachstum zuließen. In der Kultur mit 1,0% „Adhäsit“-Zugabe lag dagegen die Reaktion bei  $p_H = 9,0$  und verhinderte das Wachstum vollständig, während alle „Adhäsit“-Kulturen mit Grundlösung A und  $p_H$ -Werten von 5,4, 6,5 und 7,1 ausgezeichnete Pilzentwicklung aufwiesen. Bei Versuchsabschluß lagen die  $p_H$ -Werte meist zwischen 3,5 und 4,0, nur in zwei Fällen mit geringerer Pilzentwicklung wurde  $p_H = 5,3$  und 6,3 beobachtet. In den Kulturflüssigkeiten ohne Pilzwachstum unterblieb eine Reaktionsveränderung. Der Versuch zeigte also eindeutig, daß weder echte Schmierseifen noch sogenannte Harzseifen („Adhäsitpaste“) ein spezifisches Fungizid gegen *Botrytis* enthalten; Wachstumshemmungen, die bei derartigen Präparaten bei



geeigneter Versuchsanstellung erzielt werden, beruhen lediglich auf dem schädlichen Einfluß extrem alkalischer Reaktion.

Tab. 7 gibt die Reaktionsverhältnisse in Schmierseifenlösungen mit Wasser bzw. verschiedenen Nährlösungen als Lösungsmittel wieder. Durch verschieden starke Zurückdrängung der Alkalität entstehen sehr unterschiedliche  $p_H$ -Werte. Wenn wir nach Tab. 5 etwa  $p_H = 8,5$  als Reaktionsmaximum für *Botrytis* unter den vorliegenden Wachstumsbedingungen annehmen, so muß bei Schmierseifenzusatz zu Malzextraktlösung die Wachstumsgrenze etwa bei 1 % liegen, wie auch vorausgegangene Versuche gezeigt haben, bei WÖLTJE-Lösung und Schmierseife jedoch erst oberhalb von 3 % Zusatz (MÜLLER-STOLL 1950), denn jeweils in diesem Konzentrationsbereich wird bei den beiden Kulturflüssigkeiten die kritische Reaktion erreicht. Somit erklärt sich der beobachtete Unterschied in der hemmenden Wirkung von Seife in Nährlösungen verschiedener Zusammensetzung aus den Reaktionsverhältnissen. Je nach Stärke der sauren Pufferung der reinen Nährlösungen werden die  $p_H$ -Werte mehr oder weniger weit nach dem neutralen und sauren Reaktionsgebiet verschoben. Die Messungen in Wasser als Lösungsmittel geben ein Bild von der Eigenreaktion des untersuchten Schmierseifenmittels (Tab. 7).

Tabelle 7.  $p_H$ -Werte von Lösungen gewöhnlicher Rebschmierseife in Wasser, 5% igem Malzextrakt und Nährlösung nach WÖLTJE als Lösungsmittel. Elektrometrische Messungen nach Austreiben der Kohlensäure im siedenden Wasserbad.

Seifen- konzentration	Lösungsmittel		
	Stuttgarter Leitungswasser	5% ige Malzextraktlösung	Nährlösung nach WÖLTJE (S. 456)
3,0 %	9,80	8,95	8,10
2,0 %	9,75	8,40	7,80
1,0 %	9,55	8,05	7,35
0,5 %	8,95	7,45	6,85
0,25 %	8,42	6,70	6,20
0,1 %	8,27	6,20	5,40
0,05 %	8,20	5,75	4,45
0,025%	8,20	5,60	4,32
ohne Seife	8,10	5,50	4,20

Die geprüften Seifen- und Seifenersatzstoffe besitzen ganz verschiedene Eigenreaktion in wäßrigen Lösungen ohne andere Beimischungen (Tab. 8). Die höchste Alkalität wurde bei den eigentlichen Schmierseifenmitteln (Cottonölseife und gewöhnlicher Rebschmierseife) gefunden; die Reaktion liegt bis herunter zu einer Konzentration von etwa 0,5 % über  $p_H = 8,0$ . Etwas weniger extrem sind die Verhältnisse bei Altmanns flüssiger Pflanzenschmierseife und bei den Harzseifenmitteln; in stärkeren Lösungen überschreitet die Reaktion kaum noch  $p_H = 9,0$ . Bei geringerer



Konzentration bewegt sich der Wert bereits nahe dem Neutralpunkt. „Netzmittel Urania“ reagiert in höherer Konzentration noch alkalisch, in verdünnten Lösungen schwach sauer; die Alkalität erreicht jedoch niemals eine für den Pilz schädliche Höhe. Das Mittel „Solvit“ endlich besitzt in allen Konzentrationen schwach saure Reaktion ( $p_H = 6,6$  bis  $5,6$ ). Auch die nicht in Tab. 8 aufgeführten Mittel „2002 N“<sup>1</sup> und „Agrotin“ reagieren mehr oder weniger sauer; bei „2002 N“ wurden Werte unter  $p_H = 6,0$  gemessen.

Tabelle 8. Reaktionsverhältnisse der untersuchten Seifen- und Seifenersatzmittel in verschiedenen Konzentrationen als zusatzfreie Lösungen in destilliertem Wasser. Colorimetrische Bestimmungen mit Lyphan-Indicatorstreifen.

	Konzentration <sup>2</sup>							
	5,0%	3,0%	2,0%	1,0%	0,5%	0,3%	0,2%	0,05%
Gewöhnliche								
Rebschmierseife	9,8	9,6	9,6	9,5	9,1	8,5	8,1	7,4
Cottonölseife. . . .	9,8	9,8	9,5	9,5	9,2	8,6	8,0	7,5
Altmanns								
flüssige Seife . . .	8,9	8,8	8,5	8,2	8,0	7,8	7,5	7,1
„Adhäsitpaste“ . .	9,0	8,8	8,6	8,5	8,3	8,0	7,7	7,2
„Audelina“ . . . .	9,2	9,0	9,0	8,8	8,5	8,0	7,6	7,4
„Netzmittel Urania“	8,0	7,6	7,4	7,2	6,8	6,6	6,4	6,0
„Solvit“ . . . . .	6,6	6,4	6,0	6,0	6,0	5,8	5,6	5,6

Ein Wachstumsversuch in WÖLTJE-Lösung mit Zusätzen verschiedener Seifen- und Seifenersatzmittel in Konzentrationen von 0,5—5,0% zeigte, daß das Pilzwachstum gerade bei derjenigen Konzentration eines Zusatzstoffes aufhört, mit der das Reaktionsmaximum für *Botrytis* überschritten wird (Tab. 9). Einschränkend ist dazu zu bemerken, daß diese Feststellung nur bis zu Konzentrationen von 5% (bei „Solvit“ 12,5%) experimentell belegt wurde; bei noch höheren Mittelzusätzen mag auch unabhängig von der Reaktion in diesem und jenem Fall das Wachstum aufhören, doch scheiden derartige Fälle, in denen das betreffende Mittel mengenmäßig bereits einen wesentlichen Bestandteil des Nährsubstrates ausmachen würde, hier aus der Betrachtung aus. Präparate wie „Netzmittel Urania“, „Solvit“ und „Agrotin“, deren Eigenreaktion den kritischen  $p_H$ -Wert von 8,2 nicht überschreitet, ließen in Kulturen mit WÖLTJE-Lösung selbst bei dem höchsten geprüften Zusatz noch mehr oder weniger gutes Wachstum zu. Bei hochalkalischen Seifenmitteln hörte dagegen die Pilzentwicklung bei bestimmter Konzentration auf, bei gewöhnlicher Rebschmierseife als Zusatz zu WÖLTJE-Lösung zwischen 3 und 4%, bei „Adhäsitpaste“ zwischen 4 und 5%; ein Blick auf Tab. 7

<sup>1</sup> Versuchspräparat der I. G. Farbenwerke Höchst a. M. aus dem Jahre 1936, chemisch wahrscheinlich dem „Agrotin“ ähnlich (vgl. MÜLLER-STOLL 1950).

<sup>2</sup> Für „Solvit“ gilt in jeder Stufe der zweieinhalbfache Wert.

zeigt, daß jeweils in diesen Konzentrationsbereichen das Reaktionsmaximum ( $p_H = 8,2-8,5$ ) überschritten wird.

Tabelle 9. Wachstum von *Botrytis cinerea* in Nährlösungen mit hochprozentigen Mittelzusätzen zu WÖLTJE-Lösung. Myceltrockengewichte in Gramm nach 10 tägigem Wachstum bei  $27^\circ C$ .

	Konzentration der Mittelzusätze				
	0,5%	2,0%	3,0%	4,0%	5,0%
Gewöhnliche					
Rebschmierseife . .	0,550	0,788	0,338	0,0	0,0
„Adhäsitpaste“ . . .	0,563	0,635	0,420	0,305	0,0
„Netzmittel Urania“ .	0,438	0,449	0,372	0,268	0,254
„Solvit“ . . . . .	0,560	0,675	0,676	0,606	0,600
„Agrotin“ . . . . .	0,450	0,422	0,428	0,418	0,405

Kontrolle ohne Zusatz: 0,564 (Mittelwert aus 4 Einzelversuchen).

Bislang wurde lediglich die in künstlichen Kulturen erzeugte Mycelmasse als Kriterium für den Einfluß der Seifen- und Seifenersatzstoffe auf *Botrytis* benutzt. Damit ist vor allem der Vorteil verbunden, daß dem Pilz während der mehrere Tage währenden Versuchsdauer Gelegenheit gegeben ist, ungünstige Bedingungen selbst auszugleichen oder sich ihnen anzupassen; damit wird den natürlichen Verhältnissen weitgehend Rechnung getragen. Durch die oft benutzte Beobachtung der Conidienkeimung lassen sich ebenfalls wertvolle Feststellungen treffen, die jedoch über die weitere Entwicklung des Pilzes nichts aussagen können. Ich führte einige Versuche über die Keimung von *Botrytis*-Conidien in seifen- und seifenersatzmittelhaltigen Lösungen durch und fand dabei die über die Bedeutung der Reaktion gemachten Feststellungen bestätigt. Die Keimversuche wurden in Lösungen durchgeführt, die außer dem zu prüfenden Mittel nur noch 5% Rohrzucker enthielten, also keine anderen, die Eigenreaktion der Präparate beeinflussenden Stoffe. 10 bis 12 Std nach Beimpfen der Lösungen mit reifen Conidien (etwa 200 je  $mm^3$  Flüssigkeit) wurden gekeimte und nicht gekeimte Conidien mikroskopisch ausgezählt. Wie zu erwarten, keimten die *Botrytis*-Conidien unter diesen Bedingungen in Schmierseifenlösungen erst bei sehr geringen Konzentrationen. 1,0 und 5% ige Lösungen verhinderten die Keimung vollständig, da der  $p_H$ -Wert (9,0—9,5) jenseits des Reaktionsmaximums lag. In neutralisierten Seifenlösungen war natürlich die Wachstums- hemmung aufgehoben. Erst in 0,1% iger Weinbergschmierseife keimten etwa 7—10% der Conidien ( $p_H = 8,05$ ). In stärkeren Lösungen fand sich nur gelegentlich unter 100 ungekeimten Conidien eine einzige mit einem kurzen Keimschlauch, der aber unter Granulation des Inhaltes meist abgestorben war. Es ist jedoch denkbar, daß gerade solche vereinzelter Conidien einer gewissen Anpassung fähig sind und selbst unter schwierig-

sten Verhältnissen kleine Mycelien zu bilden vermögen, wie es in den oben besprochenen Versuchen mehrfach vorkam. Bei Konzentrationen unter 0,1% Schmierseife nahm die Keimfähigkeit der *Botrytis*-Conidien sehr rasch zu und erreichte in 0,05% igen Lösungen bereits 60—70% (Kontrollwert 85%). Mit Ausnahme von Cottonölschmierseife lag die Konzentration für die Conidienkeimung bei allen übrigen Präparaten ihren Reaktionsverhältnissen entsprechend mehr oder weniger höher. In 1% igen Lösungen von Altmanns flüssiger Seife, „Adhäsitpaste“ oder „Audelina“ keimten 8—15% der Conidien ( $p_H = 8,0—8,4$ ); in stärkeren Lösungen blieb die Keimung aus. Wesentlich besser war dagegen die Keimung in den nicht seifenhaltigen Präparaten. Bei „Solvit“ (2,5%) war kaum ein Unterschied gegenüber dem Kontrollversuch festzustellen. Auch in 1% igen Lösungen von „Netzmittel Urania“ und „Agrotin“ war die Beeinflussung der Keimprocente nur gering. Selbst in 3- und 5% igen Lösungen dieser Mittel wurden noch zahlreiche gekeimte Conidien beobachtet; dies entspricht ihrem schwach sauren bis neutralen Charakter.

Da verhältnismäßig niedrige Seifenkonzentrationen in wäßrigen Lösungen eine stark alkalische Reaktion erzeugen, könnte man dazu verleitet werden, eine wirksame Bekämpfung des Pilzes durch hochalkalische Spritzbrühen zu versuchen. Wohl ist eine gewisse Wirksamkeit von Seifenspritzungen gegen *Botrytis* als Stiefäule durch Verhinderung eines Befalls der grünen Stiele und Kämme unreifer Trauben nicht völlig von der Hand zu weisen; gegen die Traubenfäule, bei der der Pilz als Wundparasit das reifende Beerengewebe befällt, ist jedoch keinesfalls eine ausreichende Wirkung zu erwarten, da der aus den Wundstellen ausfließende saure Beerensaft ähnliche Verhältnisse erzeugt, wie sie bei Zugabe von Seifenmitteln zu saurer Nährlösung bestehen. Der Weg zur Bekämpfung des *Botrytis*-Pilzes auf Grund seiner Alkalitätsempfindlichkeit läßt sich in der Praxis wohl kaum mit Erfolg beschreiten (vgl. MÜLLER-STOLL 1950).

#### IV. Zusammenfassung.

1. Seifenhaltige Präparate können als Nährstoffquelle für *Botrytis* dienen und bewirken unter geeigneten Bedingungen eine bedeutende Steigerung des Mycelwachstums. Der Pilz vermag den Fettsäurerest der Seifen als Kohlenstoffquelle zu assimilieren; um eine gute Ausnutzung der Seife als Nährstoff zu ermöglichen, müssen gleichzeitig andere, leicht assimilierbare C- und N-Quellen zur Verfügung stehen. Wird Seife als einzige organische Substanz geboten, so ist das Pilzwachstum nur schwach.

2. Den reinen hochmolekularen Fettsäuren (Stearin-, Palmitin- und Ölsäure) fehlen — ebenso wie ihren Alkalisalzen — fungizide Eigenschaften gegenüber *Botrytis*; sie können in gewissem Umfang ebenfalls als Nährstoffe verwertet werden.

3. Die hemmende Wirkung reiner Seifenlösungen auf Conidien und Mycel von *Botrytis* beruht auf ihrer hochalkalischen Reaktion; durch teilweise Neutralisation der OH-Ionen wird die Wachstumshemmung auf-

gehoben. Das Reaktionsmaximum für *Botrytis* liegt etwa bei  $p_H = 8,5$ . In Mischung mit Nährlösungen verhindern die geprüften Mittel die Pilzentwicklung nur dann, wenn die Reaktion der Kulturflüssigkeit über diesem Wert liegt. Lediglich Schmierseife und seifenhaltige Ersatzmittel besitzen so stark basische Eigenschaften, daß in Verbindung mit den verwendeten Nährlösungen wenigstens durch höhere Mittelzusätze der  $p_H$ -Wert über das Reaktionsmaximum zu liegen kommt. Nicht seifenhaltige Ersatzpräparate reagieren dagegen nicht stark basisch, vielmehr meist neutral bis schwach sauer. Durch lebhaftes Säurebildungsverschiebt *Botrytis* die Reaktion der Kulturflüssigkeiten sehr rasch nach dem sauren  $p_H$ -Bereich.

4. In seifenhaltigen Lösungen gewachsene *Botrytis*-Zellen zeigen reichlich Fetteinschlüsse; durch die Fettspeicherung werden die Wachstumsfähigkeit und aggressiven Eigenschaften des Pilzes nicht nachhaltig gehemmt. Unter geeigneten Entwicklungsbedingungen sind die Mycelien auch bei Anwesenheit von Seife infektionstüchtig.

#### Literatur.

- BEHRENS, J.: Z. Pflanzenkrkh. **3**, 82 (1893). — BOYLE, C.: Ann. Bot. **38**, 113 (1924). — BÜSGEN, M.: Flora (Jena) **111/12**, 606 (1918). — COLIN, H.: Rev. gén. Bot. I. **21**, 98 (1909). — MÜLLER-STOLL, W. R.: Phytopath. Z. **17**, 256 (1959). — NIEMEYER, L.: Wein u. Rebe **28**, Nr. 2/3 (1936). — PELTIER, G. C.: Missouri bot. Gard., annual Rep. **23**, 41 (1912). — PRATT, C. A.: Ann. Bot. **38**, 599 (1924). — SMITH, RALPH: Bot. Gaz. **33**, 421 (1902). — STAHEL, G.: Jb. Bot. **49**, 579 (1911). — WEBB, R.: Ann. Missouri bot. Gard. **6**, 201 (1919). — WILHELM, A. F.: Wein u. Rebe **26**, 29, 67 (1944). — WITSCH, H. v.: Arch. Mikrob. **14**, 128 (1948). — ZIMMERMANN, A.: Zbl. Bakter. II. **69**, 352 (1927); **70**, 51, 261, 411 (1927). — SCHMIDT, E. W.: Ber. dtsch. bot. Ges. **42**, 191 (1924).



## Sammelbericht.

### Der mikrobielle Abbau der Aminosäuren<sup>1</sup>.

Von

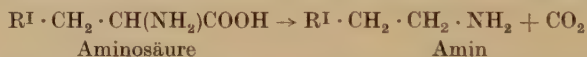
ALEXANDER JANKE.

(Eingegangen am 11. Januar 1950.)

Der mikrobielle Abbau der  $\alpha$ -Aminosäuren, zu dem offenbar die meisten Mikroben befähigt sind, kann an zwei verschiedenen Stellen des Moleküls angreifen, entweder 1. an der COOH-Gruppe (Decarboxylierung) oder 2. an der NH<sub>2</sub>-Gruppe (Desaminierung). Der erstere Vorgang geht bei saurer, der letztere bei alkalischer Reaktion vor sich; durch beide Prozesse wird die Reaktion des Substrates gegen den Neutralpunkt verschoben.

#### I. Die Decarboxylierung der $\alpha$ -Aminosäuren<sup>2</sup>.

##### A. Wirksame Mikroben und Reaktionsprodukte.



Dieser gemäß vorstehender Gleichung ablaufende Prozeß ist vor allem an Bakterien der *Coli*- und *Proteus*-Gruppe sowie an *Streptococcus*- und *Clostridium*-Arten gut studiert. Die entstehenden Amine üben teils eine toxische Wirkung aus, wie die Diamine Putrescin und Cadaverin, teils einen sympatomimetischen Einfluß, der sich in peripherer Gefäßkontraktion und Blutdrucksteigerung äußert, so das Phenyläthylamin, Agmatin, Tyramin, Tryptamin und Histamin. Alle genannten Amine sind im Mutterkorn enthalten, in dem die Decarboxylierung vor sich geht; wegen des Nachweises dieser Basen in dem genannten Dauermycel sei auf KLEIN u. BOSER (1932) verwiesen.

Für die Decarboxylierung werden am besten solche Mikroorganismen verwandt, die unter den gegebenen Wirkungsbedingungen nicht merklich desaminieren. Im folgenden sind immer die bei den einzelnen Aminosäuren benutzten Erreger sowie die erhaltenen Reaktionsprodukte angeführt.

1. Glykokoll [=  $\alpha$ -Aminoessigsäure, CH<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>) · COOH], abgebaut durch *Ps. fluorescens* zu Methylamin (CH<sub>3</sub> · NH<sub>2</sub>) (STEPHENSON u. GALE, 1937).

<sup>1</sup> Frühere Zusammenfassungen: JANKE (1930); FRANKE (1939).

<sup>2</sup> Vgl. WERLE (1943, 1948); GALE (1946).

2. dl-Alanin [=  $\alpha$ -Aminopropionsäure,  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut durch *B. coli* zu Äthylamin (STEPHENSON u. GALE, 1937).

3. l(—)-Serin [= Oxyalanin =  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -oxypropionsäure,  $\text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut durch anaerobe Fäulnisbakterien zu Colamin [= Aminoäthylalkohol  $\text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CH}_2(\text{NH}_2)$ ] (NORD, 1919).

4. d, l-Valin [=  $\alpha$ -Aminoisovaleriansäure,  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut durch Fäulnisbakterien zu Isobutylamin [=  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{CH}_2(\text{NH}_2)$ ] (NEUBERG u. KARCZAG, 1909).

5. l(—)-Leucin [=  $\alpha$ -Aminoisobutylessigsäure,  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut durch *Proteus*-Stämme zu Isoamylamin [=  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2(\text{NH}_2)$ ] (ARAI, 1921).

6. l(+)-Arginin [=  $\delta$ -Guanido- $\alpha$ -amino-n-valeriansäure,  $\text{NH}_2 \cdot \text{C}(:\text{NH}) \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut a) durch Bakterien, die Arginase enthalten, wie gewisse *Coli*-Stämme (+ *Streptococcus faecalis* R), *Proteus*- und *Bacillus*-Arten, sowie *Cl. septicum* zu Putrescin [= Tetramethyldiamin,  $(\text{NH}_2) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2(\text{NH}_2)$ ] (HIRAI, 1935; GALE, 1940<sub>3</sub>), das zufolge HERBST u. SNELL (1949) ebenso wie andere Verbindungen, die den 1,4-Diaminobutan-Rest enthalten, für *Haemophilus parainfluenzae* als essentieller Wachstumsfaktor wirkt; das gleiche Endprodukt entsteht auch aus l-(+)-Ornithin [=  $\alpha$ ,  $\delta$ -Diamino-n-valeriansäure] (GALE, 1946), ferner auch aus *Asp. oryzae* (YAMADA u. ISHIDA, 1926); b) durch Arginase-freie Bakterien, wie manche *Coli*-Stämme und *Bacillus*-Arten zu Agmatin [= l-Amino-4-guanidil-butan] (AKASI, 1939; GALE, 1940<sub>1</sub>, 1946).

7. l(+)-Lysin [=  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -Diamino-n-capronsäure,  $\text{CH}_2(\text{NH}_2) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut durch *Coli*-Stämme, *Ps. fluorescens* und *Bacillus*-Arten zu Cadaverin [= Pentamethyldiamin,  $\text{CH}_2(\text{NH}_2) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2(\text{NH}_2)$ ] (VIRTANEN u. LAINE, 1936, 1937; GALE u. EPPS, 1944; GALE, 1946).

8. l(—)-Asparaginsäure [=  $\alpha$ -Aminobernsteinsäure,  $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut durch *Rhizobium*-Arten zu  $\beta$ -Alanin [=  $\beta$ -Aminopropionsäure,  $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2(\text{NH}_2)$ ] und anderen Produkten (VIRTANEN u. LAINE, 1936, 1937). Wegen der Wuchsstoff-Wirkung des  $\beta$ -Alanins und seines Vorkommens im Molekül der Pantoensäure besonders beachtenswert.

9. l(+)-Glutaminsäure [=  $\alpha$ -Aminoglutarsäure,  $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut durch *Rhizobium*- und *Azotobacter*-Arten (VIRTANEN, RINTALA u. LAINE, 1938; VIRTANEN, LAINE u. RINTALA, 1940) sowie durch *Coli*-Stämme, *Cl. Welchii*, *Proteus*- und *Bacillus*-Arten (STEPHENSON u. GALE, 1937; GALE, 1946) zu  $\gamma$ -Aminobuttersäure [ $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2(\text{NH}_2)$ ].

10. l(—)-Tyrosin [= p-Oxyphenylalanin,  $\text{OH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut durch *Coli*-Stämme, *Streptococcus faecalis R*, Lancefield-Streptokokken sowie *Clostridium*-Arten zu Tyramin [= p-Oxyphenyläthylamin,  $\text{OH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2(\text{NH}_2)$ ] (HANKE u. KOESSLER, 1922; MEAD u. KING, 1929; HIRAI, 1933; GALE, 1940<sub>2</sub>, 1946; MCGILVERY u. COHEN, 1948). Den letztgenannten Forschern zufolge wirkte das von ihnen aus *Streptococcus faecalis R* bereitete Trockenpräparat der Tyrosin-Decarboxylase auch auf l-Phenylalanin ein, freilich in einem wesentlich geringeren Ausmaße als auf Tyrosin (etwa  $\frac{1}{100}$ ); der Nachweis des Angriffs erfolgte durch Isolierung des entstandenen  $\beta$ -Phenyläthylamins aus dem Reaktionsgemisch (vgl. auch UMBREIT, 1949).

11. l(—)-Tryptophan [= Indol-Pr. 3- $\alpha$ -Aminopropionsäure,  $\text{C}_8\text{NH}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut durch *Bact. aminophilum intestinale* zu Tryptamin [= Indoläthylamin,  $\text{C}_8\text{NH}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2(\text{NH}_2)$ ] (BERTHELOT u. BERTRAND, 1912).

12. l(—)-Histidin [=  $\beta$ -Imidazol- $\alpha$ -aminopropionsäure,  $\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ], abgebaut durch *Coli*-Stämme und *Clostridium Welchii* zu Histamin [=  $\beta$ -Imidazoläthylamin,  $\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2(\text{NH}_2)$ ], das zufolge STRAUGHN u. SEVAG (1949) ebenso wie andere Imidazol-Derivate auf *Bact. (Klebsiella) pneumoniae* eine wachstumsfördernde Wirkung ausübt (HANKE u. KOESSLER, 1922; HIRAI, 1933; GALE, 1946; EHRSIMANN u. WERLE, 1948). Den gleichen Abbau vollzieht auch das oben genannte *Bact. aminophilum intestinale* (BERTHELOT u. BERTRAND, 1912, 1918).

## B. Ausführung der Decarboxylierungen.

1. Das Arbeiten mit „wachsenden“ Kulturen (KOESSLER u. HANKE, 1919; HANKE u. KOESSLER, 1922, 1924; EGGERTH, 1939).

Die gemäß obiger Zusammenstellung in Betracht kommenden Bakterien werden in einem geeigneten flüssigen Nährboden, dem man die neutralisierte Aminosäurelösung zugesetzt hat, gezüchtet, wobei mit einer Mindestdauer von einem Monat gerechnet werden muß. Als Kulturgefäße wählt man am zweckmäßigsten ERLÉNMEYER- oder FRANKLAND-Kolben oder Steilbrustflaschen.

2. Das Arbeiten in „runder Kultur“ (GALE, 1946).

Die Mikroben werden auf einem geeigneten Gallert-Nährboden, am besten in einem Agar-Substrat, in mehreren ROUX-Flaschen oder KOLLE-Schalen als Massenkulturen gewonnen. Die erhaltenen Bakterien spült man dann mittels einer sterilen Phosphatpufferlösung ( $\text{pH} = 7$ ) — eventuell unter Zuhilfenahme von Glasperlen — ab, wäscht sie in einer Stickstoff-Atmosphäre und fügt zu dieser Suspension 1% der neutralisierten

Aminosäure bzw. des Chlorhydrats derselben hinzu. Zur Sterilhaltung wird eventuell noch Toluol zugegeben.

### 3. Die Feststellung des Abbaues.

Sie kann entweder durch Nachweis des entstandenen Amins erfolgen, indem man dasselbe in ein Salz — meist Pikrat, Pikrolonat, Chloroplatinat oder Chloraurat — überführt und von diesem den Schmelzpunkt bestimmt; oder man fängt nach VIRTANEN das frei gemachte  $\text{CO}_2$  in einem Kaliapparat auf und wägt diesen in gewissen Zeitabständen, wobei man ebenso wie bei der durch GALE (1946) angewendeten manometrischen Methode einen Einblick in den zeitlichen Reaktionsverlauf erhält. In manchen Fällen ist auch eine quantitative Bestimmung des erhaltenen Amins möglich, so kann z. B. der Tyramin-Gehalt mit 1-Nitroso-2-naphthopurpur colorimetrisch ermittelt werden.

## C. Die wirksamen Enzyme (Aminosäuredecarboxylasen).

### 1. Substratspezifität.

Die Aminosäure-Decarboxylasen sind zum Teil substratspezifisch. Zunächst wird nur die natürliche, also die l-Form der Aminosäuren angegriffen; bloß beim Histidin kann auch die d-Form durch Erreger der *Coli-Typhi*-Gruppe decarboxyliert werden (WERLE, 1941). Mittels gewaschener Suspensionen von *Streptokokken* sowie von Bakterien der *Coli-Typhi*-Gruppe und *Pseudomonas*-, *Proteus*-, *Bacillus*- und *Clostridium*-Arten gelang GALE (1946) bloß die Decarboxylierung von Arginin, Ornithin, Lysin, Glutaminsäure, Tyrosin und Histidin, und zwar nur dann, wenn die  $\text{NH}_2$ - und  $\text{COOH}$ -Gruppe sowie die am anderen Ende noch vorhandene dritte polare Gruppe frei waren. Es kommen demnach 6 verschiedene substratspezifische Aminosäure-Decarboxylasen in Betracht: l-Arginin-, l-Ornithin-, l-Lysin-, l-Glutaminsäure-, l-Tyrosin- und l-Histidin-Decarboxylase.

### 2. Vorkommen der Aminosäure-Decarboxylasen.

Die genannten 6 verschiedenen Decarboxylasen finden sich in den mannigfachsten Bakterien, wie dies aus der obigen Zusammenstellung hervorgeht; keines dieser Enzyme ist jedoch konstant mit einem anderen vergesellschaftet.

Die Bildung der Aminosäure-Decarboxylasen in Bakterien ist eine *adaptive*; nur die Glutaminsäure-Decarboxylase ist *konstitutiv*, wenn auch bei ihr durch Zusatz des spezifischen Substrates eine Steigerung des Abbaues bewirkt wird. Für eine optimale Synthese der Histidin-Decarboxylase scheint ein in Nährbouillon enthaltener spezifischer Faktor notwendig zu sein (EHRISMANN u. WERLE, 1948). Auf die Enzyymbildung wirken ferner noch günstig: a) *saure Reaktion des Nährmediums*, auf dem



die Bakterien heranwachsen ( $p_H$  etwa 5—6); bei  $p_H = 4$ —5 ist die Enzymbildung noch stärker, jedoch die Bakterien-Ausbeute sehr gering; am meisten empfiehlt sich Züchtung in einer Traubenzuckernährlösung, z. B. trypsinverdautes Casein mit 1—2% Glucose + 1% der betreffenden Aminosäure. — b) *geeignete Temperatur*, die aber für die einzelnen Mikroben verschieden ist und mit deren Wachstumsoptimum nicht übereinstimmen muß; so liegt das Optimum für die Decarboxylase-Bildung für *B. coli* bei 25° C, für *Streptococcus faecalis R* und *Clostridium*-Arten bei 37° C. — c) *eine entsprechende Kulturdauer*; die Ernte wird am besten nach Beendigung der Zellteilung vorgenommen.

### 3. Gewinnung zellfreier Enzympräparate.

Am leichtesten gelingt die Herstellung von Acetondauerpräparaten, die man dann — mit Ausnahme der Tyrosin-Decarboxylase — mit alkalischen Pufferlösungen ( $p_H = 8,0$ —9,0) extrahiert (EPPS, 1944, 1945; GALE u. EPPS, 1944; TAYLOR u. GALE, 1945); hierbei tritt jedoch eine weitgehende Zerstörung der Ornithin- und der Histidin-Decarboxylase ein. Die Reinigung der erhaltenen Lösung erfolgt durch Adsorption an Tonerde Cy oder an Ca-Phosphat und Fraktionierung mittels Ammoniumsulfat. Zum Herauslösen der Tyrosin-Decarboxylase kann ein Acetat-Puffer vom  $p_H = 5,5$  Verwendung finden.

Zellfreie Zubereitungen der Ornithin-Decarboxylase werden durch Zerkleinerung der Zellen mit anschließendem Ausschleudern gewonnen (z. B. TAYLOR u. GALE, 1945).

Zur Gewinnung einer bestimmten Aminosäure-Decarboxylase geht man von Mikroben aus, die nur diese allein enthalten (GALE, 1946); im einzelnen werden die nachfolgenden Bakterien empfohlen:

- a) für l-Arginin-Decarboxylase: *B. coli* (N. C. Type Cult. Nr. 7020);
- b) für l-Ornithin-Decarboxylase: *Clostridium septicum Pasteur III* (N. C. T. C. Nr. 547);
- c) für l-Lysin-Decarboxylase: *Bact. cadaveris* (N. C. T. C. Nr. 6578);
- d) für l-Glutaminsäure-Decarboxylase: *Clostridium Welchii* A. S. R. 12 (nicht acetonbeständig) oder Bakterien der *Coli*-Gruppe;
- e) für l-Tyrosin-Decarboxylase: *Streptococcus faecalis R*.
- f) für l-Histidin-Decarboxylase: *Clostridium Welchii* B. W. 21 (die begleitende Glutaminsäure-Decarboxylase wird zerstört).

### 4. Wirksamkeit der Decarboxylasen.

Die Decarboxylasen wirken streng spezifisch nur auf die entsprechende Aminosäure, deren polare Gruppen an den Molekülen ebenso wie die COOH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen frei sein müssen. Wohl aber können andere polare Gruppen besetzt sein; so wirkt die l-Tyrosin-

Decarboxylase auch auf Dopa (1-3,4-Dioxyphenylalanin). Die  $p_H$ -Optima der zellfreien Zubereitungen liegen im sauren Gebiet ( $p_H = 4,5$  bis 6).

Da die Decarboxylierung 100 % ige ist, kann mittels der oben erwähnten manometrischen Methode eine quantitative Bestimmung der betreffenden Aminosäure vorgenommen werden; aus Racematen läßt sich so die d-Form gewinnen.

Eine Hemmung der Decarboxylase-Wirkung tritt durch Aldehyd-reagentien und Blausäure ein, was auf eine Carbonyl-Gruppe im Molekül hindeutet.

### 5. Die Co-Aminosäure-Decarboxylase.

Eine Trennung der Aminosäure-Decarboxylasen in Apo- und Co-enzym gelang bei Lysin-, Tyrosin-, Arginin- und Ornithin-Decarboxylase durch Fällung mittels ammoniakalischer Ammoniumsulfat-Lösung. Die 4 Apoenzyme können durch Zugabe einer Aufkochung irgendeines der 4 unbehandelten Enzyme oder durch Hefekochsaft wieder zu den entsprechenden Decarboxylasen vervollständigt werden; es liegt demnach bei diesen 4 Decarboxylasen ein einheitliches Coenzym vor. Bei der Glutaminsäure-Decarboxylase war eine (wenn auch nur unvollständige) Trennung in Agon und Pheron durch 24stündige Dialyse bei  $p_H = 2,0$  und  $0^\circ \text{C}$  möglich, während bei der Histidin-Decarboxylase eine solche bisher nicht gelang (GALE u. EPPS, 1944).

Die Co-Decarboxylase ist in der Natur weit verbreitet, so in Pflanzen, Rattengewebe, Kuhmilch und Hefe; von den Bakterien enthalten sie auch jene, die keine aktive Aminosäure-Decarboxylase aufweisen.

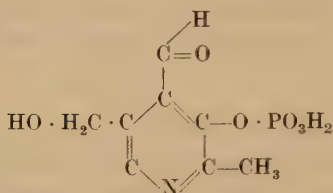
Von den Metallsalzen der Co-Decarboxylase sind das Ag-, Hg- und Pb-Salz in Säure löslich und werden bei  $p_H = 7$  wieder gefällt. Das Ba-Salz ist bei allen  $p_H$ -Werten in Wasser löslich, wird aber bei  $p_H = 7$  durch 60 % iges Methanol oder Äthanol ausgeschieden.

Die freie Co-Decarboxylase ist in Methanol und Äthanol löslich, wird durch Phosphorwolframsäure gefällt und weist bei Siedetemperatur gegen Natronlauge (bis 1,0 n) auffallende Beständigkeit auf, nicht aber gegen schwache Säuren. Reine Präparate sind relativ unbeständig.

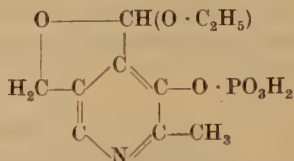
Wegen der Darstellung der Co-Decarboxylase aus Brauerei-Trockenhefe durch milde Barytlauge-Extraktion und der Reinigungsmethode sei auf EPPS (1944) und GALE (1946) verwiesen.

Was die chemische Zusammensetzung anlangt, scheinen alle Aminosäure-Decarboxylasen — mit Ausnahme der Histidin-Decarboxylase — das gleiche Co-Enzym zu besitzen und dieses dürfte mit Pyridoxalphosphat identisch sein, das auch durch Pyridoxal und Adenosin-

triphosphorsäure (A.T.P.) ersetzbar ist (BELLAMY u. GUNSALUS, 1944<sub>1, 2</sub>; GUNSALUS, BELLAMY u. UMBREIT, 1944; HARRIS, HEYL u. FOLKERS, 1944; BADDILEY u. GALE, 1945; UMBREIT u. GUNSALUS, 1945; UMBREIT, 1949). Was den Bindungsort der Phosphorsäure anlangt, scheint es sich um das Pyridoxal-3-phosphat zu handeln, dessen Äthylacetal durch KARRER u. Mitarb. ebenfalls wirksam befunden wurde (KARRER u. VISCONTINI, 1947; KARRER, VISCONTINI u. FORSTER, 1948).



Pyridoxal-3-phosphat



Pyridoxalacetal-3-phosphat

Je nach dem Apo-Enzym, mit dem das Pyridoxalphosphat zusammentritt, entstehen die einzelnen substratspezifischen Aminosäure-Decarboxylasen, die alle die gleiche Wirkungsspezifität aufweisen.

Die Tyrosin-Decarboxylase in Aceton-Dauer-Präparaten des *Streptococcus faecalis* R decarboxyliert außer p-Oxyphenylalanin auch Phenylalanin (UMBREIT, 1949) sowie Dopa (= m-, p-Dioxyphenylalanin), nicht hingegen m-Oxyphenylalanin, das aber durch das entsprechende Enzym aus Meerschweinchenniere decarboxyliert wird (BLASCHKO u. STANLEY, 1948).

Die Asparaginsäure-Decarboxylase ist bloß von schwacher Wirksamkeit und tritt nur in geringer Konzentration auf (MARDASHEV, 1947; MARDASHEV u. GLADKOVA, 1948; MARDASHEV u. ETINGOF, 1948); sie wurde mit gewaschenen Suspensionen von *Rhizobium trifolii* durch BILLEN u. LICHSTEIN (1949) genauer untersucht und konnte aus *Bact. (Escherichia) coli* in zellfreiem Zustand gewonnen werden (ROPER u. MCILWAIN, 1948).

Die Histidin-Decarboxylase wird von Darmbakterien, vor allem von *B. coli*, sowie von *Clostridium Welchii* gebildet und greift in den meisten Fällen sowohl die l- als auch die d-Form der Aminosäure an; sie wirkt bei pH 5,0—5,5 optimal und wird durch HCN, sowie durch Carbonylgruppenreagentien und die Ketonreagentien von GIRARD gehemmt. Die Wirkung gleichzeitig anwesender Histaminase läßt sich durch Zusatz von Putrescin zum Ansatz ausschalten (WERLE, 1941; EHRLSMANN u. WERLE, 1948). Die Histidin-Decarboxylase bildet aus Histidin-Dipeptid anscheinend substituierte Histamine (GEIGER, 1948).

## II. Die Desaminierung der $\alpha$ -Aminosäuren.

### A. Allgemeines.

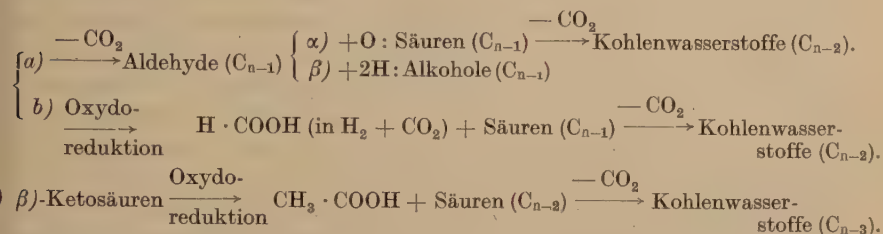
Die mikrobiologische  $\text{NH}_3$ -Abspaltung aus  $\alpha$ -Aminosäuren, zu der die Mehrzahl der Bakterien mit Ausnahme der meisten *Strepto*- und *Staphylokokken* befähigt ist, kann sowohl auf aerobem als auch auf anaerobem Wege erfolgen. Dabei entstehen gemäß der nachfolgenden Übersicht die verschiedensten Säuren mit gleicher Anzahl der C-Atome; durch Kürzung

der C-Kette können diese dann weiter in niedriger molekulare Fettsäuren, Alkohole und Kohlenwasserstoffe übergehen. Bei den heterozyklischen Aminosäuren kommen auch Ringöffnungen vor.

*Desaminierungsprodukte der  $\alpha$ -Aminosäuren ( $C_n$ )* (Formelbilder unten):

Ungesättigte Fettsäuren ( $C_n$ ).

$\alpha$ -Ketosäuren ( $C_n$ )



Oxysäuren ( $C_n$ ).

Gesättigte Fettsäuren ( $C_n$ )  $\xrightarrow{-CO_2}$  Kohlenwasserstoffe ( $C_{n-1}$ ). Dazu kommen noch

Ringöffnungen und

Abbau des Arginins zu Ornithin.

*Reaktionsmechanismus.* Auf Grund seiner Feststellung, daß Histidin durch Bakterien der *Coli-Typhi*-Gruppe in die Imidazol-acrylsäure übergeht, nimmt RAISTRICK (1917) an, daß die ungesättigten Fettsäuren ganz allgemein das erste Produkt der Aminosäure-Desaminierung darstellen, aus denen zunächst — ohne Kettenkürzung — die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketosäuren sowie die Oxysäuren und gesättigten Fettsäuren hervorgehen, die dann einen weiteren Abbau erleiden können. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die  $\alpha$ -Ketosäuren, denen im Abbau zweifelsohne eine zentrale Stellung zukommt, auch noch auf einem anderen Wege, nämlich über die Iminosäuren, entstehen. Es ergibt sich demnach für die ohne Kettenkürzung verlaufenden Umsetzungen das folgende Schema:

*Faktoren, die den Abbautypus beeinflussen:* Unter diesen kommt

1. den wirksamen Mikroben die größte Bedeutung zu: a) *Bakterien* vermögen die Desaminierung nach sämtlichen Typen vorzunehmen, wobei sich die Anaerobier aber meist auf die Bildung von Fettsäuren und Kohlenwasserstoffen nach 2b und 5 beschränken. Die Heranzüchtung der Bakterien muß bei alkalischer Reaktion vorgenommen werden, da im sauren Gebiet Aminosäure-Decarboxylasen entstehen. — b) *Sproßpilze* (*Hefen*) bewirken die Desaminierung meist nach 2a $\beta$ , wobei sich höhere Alkohole (Fuselöle) bilden. — c) *Hyphenpilze* führen die Aminosäuren meist nach 4 in Oxysäuren über, die mitunter auch eine vollständige Oxydation erleiden.





ELLE, 1944). Auf d-Cystein ist *Bact. coli* wirkungslos, desgleichen *Bac. subtilis*, der äquivalente Mengen von  $\text{NH}_3$  und  $\text{H}_2\text{S}$  bildet und bei  $42^\circ\text{C}$  und  $\text{pH} = 6,7$  optimal wirkt (FROMAGEOT u. TCHEN-PAU, 1941). Eine Hemmung durch Sauerstoff findet bei dieser *Bacillus*-Art nur bei relativ hohen  $\text{O}_2$ -Drucken ( $\text{p}_{\text{O}_2}$  150 mm Hg) statt (CHAIX u. TCHEN-PAU, 1943). — d) Beim Abbau des Serins durch *B. coli* muß der OH-Gruppe eine besondere Bedeutung zukommen, da ihre Substituierung ein Ausbleiben der Desaminierung nach sich zieht (vgl. weiter unten). — e) Valin wird ähnlich wie Glykokoll und Betain von den gewöhnlichen Bakterien nur schwer angegriffen, wohl aber durch *Bac. valinovorans* und *Bac. dentatus* BR. et H. (HEIGENER, 1935).

Durch die einzelnen Mikroben werden nicht alle Aminosäuren desaminiert. So stellten COHEN, RAYNAUD, COHEN-BAZIRE u. NISMAN (1947) fest, daß Suspensionen von *Clostr. saccharobutyricum* und *Clostr. sporogenes* Glykokoll, Alanin,  $\beta$ -Alanin, Cystein, Cystin, Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Lysin, Tryptophan und Phenylalanin nicht desaminieren; der zweitgenannte Anaerobier war im Gegensatz zu den Beobachtungen STICKLANDS auch nicht imstande, Serin zu desaminieren, wohl aber gelang dies durch *Clostr. saccharobutyricum*. Dieser Anaerobier spaltete auch aus Asparagin- und Glutaminsäure, Arginin, Tyrosin und Histidin  $\text{NH}_3$  ab, während dies mittels *Clostr. sporogenes* nur bei Glutaminsäure, Arginin und Ornithin gelang.

Ähnliche Verschiedenheiten in der Desaminierung der einzelnen Aminosäuren wurden auch bei *Schimmelpilzen* beobachtet. So wies WOLF (1948) mittels der manometrischen Methode nach, daß *Penicillium chrysogenum* Stamm Q-176 Alanin, Glutaminsäure und Prolin am raschesten oxydiert, während Cystin nicht und Glykokoll, Valin, Isoleucin, Asparaginsäure und Cystein nur langsam desaminiert werden; die restlichen Aminosäuren zeigten einen gemäßigten Abbau.

Die Bildung von  $\text{H}_2\text{S}$  aus Cystein erfolgt durch das Enzym Cysteinase. Liegt Cystin vor, so wird dieses zunächst zu Cystein hydriert und zwar entweder durch Glucose bzw. eine andere reduzierende Substanz oder aber durch elementaren Wasserstoff, sofern die betreffenden Mikroben über das Enzym Hydrogenase verfügen.

Die Cysteinase des *B. coli* und des *Proteus vulgaris* ist ein adaptives Enzym, das nur die l-Form angreift und durch Glucose etwas gehemmt wird. Im Gegensatz hierzu hat das im *Propionibacterium pentosaceum* enthaltene Enzym einen konstitutiven Charakter und erfährt durch Glucose eine Beschleunigung seiner Wirkung (DESNUELLE u. FROMAGEOT, 1939; DESNUELLE 1939, 1940).

Die Enzym-Reaktion erfährt zufolge FROMAGEOT u. TCHEN-PAU (1943) durch Hydroxylamin, Hydrazin, Semicarbazid und KCN eine Hemmung, was für das Vorhandensein einer Carbonyl-Gruppe im aktiven Teil des Cysteinase-Moleküls spricht.

Bei der Eiweißfäulnis entsteht relativ viel Methylmercaptan ( $\text{CH}_3 \cdot \text{SH}$ ).

### B. Desaminierung zu ungesättigten Fettsäuren.

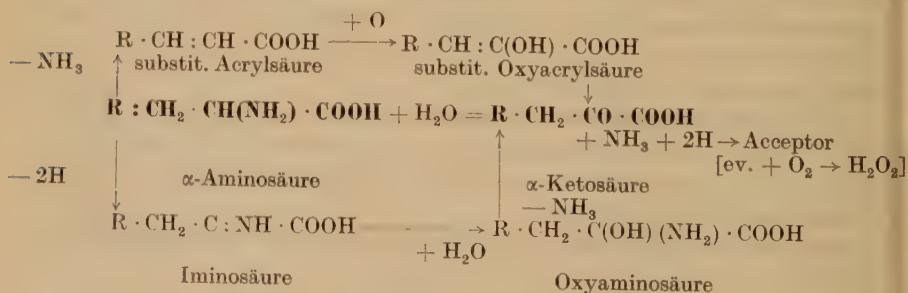
Hierbei entstehen aus den einbasischen Aminosäuren substituierte Acrylsäuren, vor allem durch die Bakterien der *Coli-Typhi*-Gruppe, so aus dem l-Histidin in RINGER-Lösung die *Imidazol-acrylsäure* oder „*urocanic-acid*“ (RAISTRICK, 1917). Aus der zweibasischen l(—)-Asparaginsäure geht unter dem Einfluß der spezifisch wirkenden Aspartase (Fumaraminase) die Fumarsäure hervor. Letztgenanntes Enzym findet sich vor allem in fakultativ anaeroben Bakterien und ist aus *Ps. fluorescens* durch VIRTANEN u. TARNANEN (1931, 1932) sowie aus zellfreiem Saft von *Bact. coli* mittels fraktionierter Fällung durch GALE (1938) gewonnen worden; diese *Coli*-Aspartase (Aspartase II), deren  $pH$ -Optimum zwischen 7,0 und 7,5 liegt, wird durch Toluol gehemmt und benötigt ein Co-Enzym, das durch Adenosin vertretbar, vielleicht auch mit diesem wesensgleich ist.

Wenn man mittels gewaschener Suspensionen von Bakterien, z. B. von *B. coli*, die  $NH_3$ -Abspaltung aus Asparaginsäure unter Fumarsäure-Bildung bewirken will, müssen die Suspensionen vorher mit 2% Cyclohexanol behandelt werden, um das Enzym Fumarase zu hemmen, da dieses sonst die Fumarsäure unter Wasser-Anlagerung in Äpfelsäure überführen würde (COOK u. WOOLF, 1928; WOOLF, 1929).

Den ungesättigten Fettsäuren wird im mikrobiellen Aminosäure-Abbau eine zentrale Stellung eingeräumt, wie sich aus obigem Schema ergibt.

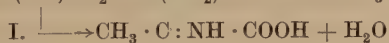
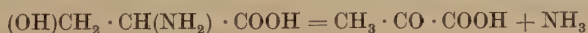
### C. Desaminierung über $\alpha$ -Ketosäuren.

Es handelt sich um eine Dehydrierung, die aber nicht nur durch aerobe Organismen, sondern auch durch Anaerobier ausgeführt werden kann, in welch letzterem Falle andere Aminosäuren die Rolle von Wasserstoff-Acceptoren übernehmen (STICKLAND-Reaktion, S. 492). Sofern unter aeroben Bedingungen der Luftsauerstoff als Acceptor für den Wasserstoff dient, entsteht hierbei  $H_2O_2$ . Wie bereits oben ausgeführt wurde, kann der Reaktionsweg möglicherweise über die ungesättigte Fettsäure oder über die Iminosäure führen.



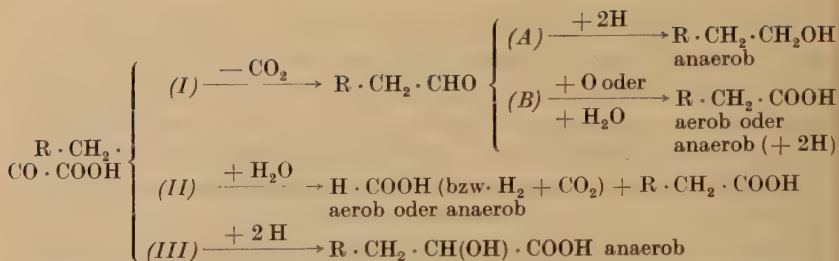
Aus den Amino-Monocarbonsäuren entstehen so — außer der Glyoxylsäure — substituierte Brenztraubensäuren, aus den Amino-Dicarbonsäuren aber Oxalessigsäure bzw.  $\alpha$ -Ketoglutar säure. Viele dieser Ketosäuren sind nur schwierig nachweisbar, da sie wegen ihrer Instabilität — vor allem in der Enol-Form — rasch einem weiteren Abbau verfallen. Jedoch ist ihre Abfangung verschiedentlich gelungen, so jene der Glyoxylsäure mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazins (JANKE u. TAYENTHAL, 1936; EGAMI, 1938), ferner der Brenztraubensäure unter teilweiser Verwendung des gleichen Abfangmittels, und zwar nicht nur allein bei Einwirkung von Bakterien (AUBEL u. EGAMI, 1935; STEPHENSON, 1949), sondern auch bei jener von Pilzen, wie *Fusarium lini* (WIRTH u. NORD, 1943), auf Alanin. Auch durch *Asp. oryzae* konnte eine Reihe von Aminosäuren in die entsprechenden Ketosäuren übergeführt werden (UYEMURA, 1937, 1939). Mitunter kann auch aus der Hemmungswirkung von Salzen der  $\alpha$ -Ketosäuren auf die  $\text{NH}_3$ -Entwicklung aus Aminosäuren das Vorliegen eines Gleichgewichtes zwischen diesen und den erstgenannten Säuren erschlossen werden. So haben COHEN-BAZIRE u. SAISSAC (1947) eine solche hemmende Wirkung beim Zusatz von  $\alpha$ -Ketoglutarat auf die Desaminierung der Glutaminsäure durch *Clostridium sporogenes* beobachtet.

Aber auch unter anaeroben Bedingungen kann aus  $\alpha$ -Aminosäuren Brenztraubensäure entstehen; so gelang es DESNUELLE, GRAND u. FROMAGEOT (1944) bei der Einwirkung von *B. coli* auf l-Alanin oder dl-Serin diese Ketosäure als Dinitrophenylhydrazon zu isolieren. Beim Serin dürfte die OH-Gruppe am  $\beta$ -Kohlenstoff beteiligt sein, da O-Methylserin nicht angegriffen wird. Es handelt sich wahrscheinlich um eine innere Dismutation, die über die Iminosäure führt, gemäß der Gleichung



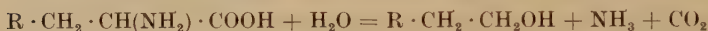
Weiterer Abbau der  $\alpha$ -Ketosäuren. Er tritt meist leicht ein und kann (I) durch Decarboxylierung über den um ein C-Atom ärmeren Aldehyd verlaufen, der dann seinerseits (A) eine Hydrierung zum entsprechenden Alkohol oder (B) eine Dehydrierung zur Fettsäure erleidet; es handelt sich demnach um das normale Schema des Kohlenhydrat-metabolismus, worauf ANDERSON (1947) anlässlich seiner Untersuchungen über die Einwirkung von *Proteus* auf Asparagin- und Glutaminsäure hingewiesen hat. (II) unter Abspaltung von Ameisensäure die um ein C-Atom ärmere Fettsäure (wie in IB) liefern oder schließlich (III) durch Hydrierung in die Oxsäure mit gleicher Anzahl von C-Atomen übergehen.





Wegen der experimentellen Stützung der hier angegebenen Reaktionswege sei auf die bei JANKE (1930) angeführte ältere Literatur verwiesen.

*1. Desaminierung zu den um ein C-Atom ärmeren Alkoholen  
(alkoholische Gärung der Aminosäuren nach F. EHRLICH).*



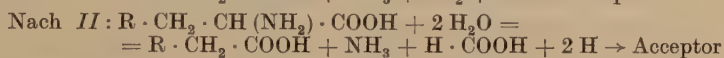
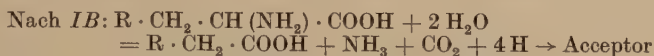
In diesem Fall wird der nach Reaktion (I) entstehende Aldehyd gemäß (A) zum entsprechenden Alkohol hydriert. Diese endotherme Reaktion erfolgt nur bei Gegenwart von Zucker oder anderen als Energiequelle geeigneten Kohlenhydraten bei gleichzeitigem N-Mangel. Zumeist wird nur die natürlich vorkommende l-Form vergoren, so daß aus der racemischen Verbindung die d-Form (wenigstens teilweise) zurückbleibt und gewonnen werden kann, wie dies in neuerer Zeit KOCHER u. VÖGLER (1948) beim dl-Methionin gezeigt haben, nachdem durch VÖGLER (1947) festgestellt worden war, daß das natürlich vorkommende Methionin der l-Reihe angehört. Bei einigen Aminosäuren (Asparaginsäure, Tyrosin und Prolin) tritt die Spaltung der Racemate nur bei Gegenwart von Wachstumsfaktoren (EHRLICH, 1929) ein, ohne solche erfolgt dieselbe symmetrisch. Auf vorstehende Weise wird bei der alkoholischen Gärung durch Hefen aus den Aminosäuren der letzteren das sogenannte Fuselöl gebildet. Dessen Hauptbestandteile sind: *Isobutylalkohol*  $[\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{CH}_2\text{OH}]$  aus l(+)-Valin, *Isoamylalkohol*  $[\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2\text{OH}]$  aus l-Leucin, *aktiver Amylalkohol*  $[\text{CH}_3 \cdot \text{C}(\text{CH}_3)\text{OH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_3]$  aus l(+)-Isoleucin; ferner finden sich noch *normaler Amylalkohol* (aus Norleucin), *Tyrosol* (aus Tyrosin), *Tryptophol* (aus Tryptophan) und *Histidol* (aus Histidin) vor. Ornithin hingegen erleidet gemäß den Feststellungen von THORNE (1937) einen abweichenden Abbau, bei dem ein Gemisch von Butylenglykol und Bernsteinsäure entsteht. Wegen der aus den einzelnen Aminosäuren durch Saké-Hefe erhaltenen Produkte sei auf YAMADA (1935) verwiesen.

Die alkoholische Gärung der Aminosäuren wird durch Kulturhefen, wilde Hefen, *Mycoderma*-Arten, *Pullularia* (*Dematium*) *pullulans* und verschiedene Schimmelpilze hervorgerufen und zwar wirken nur die lebenden Mikroben, nicht aber deren Preßsäfte und Acetondauerpräparate.

Die gleichen Alkohole können aus den Aminosäuren aber auch noch auf einem anderen Reaktionsweg, nämlich über die durch Entcarboxylierung derselben sich bildenden *Amine* (S. 472), entstehen. Auch in diesem Fall scheint der Weg über den Aldehyd zu führen, so daß keine Hydrolyse sondern eine Oxydoreduktion vorliegt, die durch eine spezifische Monoamino-oxyhydrase der wirksamen Mikroben, nämlich Schimmelpilzen und luftliebenden Sproßpilzen, katalysiert wird.

## 2. Desaminierung zu den um ein C-Atom ärmeren Fettsäuren.

Solche gesättigten Fettsäuren können aus den intermediär gebildeten  $\alpha$ -Ketosäuren entweder nach *IB* durch Decarboxylierung über den Aldehyd oder nach *II* durch Zerfall auf oxydoreduktivem Wege unter Wasseraufnahme neben Ameisensäure entstehen; letztere spaltet sich meist in  $H_2$  und  $CO_2$ .



Als Wasserstoff-Acceptoren kommen Zwischenprodukte der alkoholischen Gärung, Chinone, m-Dinitrobenzol oder Luftsauerstoff in Betracht; im letzteren Falle entsteht bei der Bildung der Ketosäure durch Aufnahme von 2 Wasserstoffatomen  $H_2O_2$ , das dann den Aldehyd zur Säure oxydiert. Sofern dieser Prozeß durch aerobe Bakterien durchgeführt wird, geht er am besten bei der schwach alkalischen Reaktion des HENDERSONSchen Phosphatgemisches ( $m/_{10}$  prim. +  $9/_{10}$  msec;  $p_H = 7,7$ ) vor sich. Gegenwart von *Zuckerarten*, aus denen durch die Bakterien Säuren entstehen, wirkt hemmend, so bei *Ps. aeruginosa*, *B. prodigiosum*, *B. typhi* und *Proteus vulgaris*; bei *B. coli* jedoch soll zufolge STEPHENSON u. GALE (1937) die Beeinträchtigung der Desaminierung durch Glucose in erster Linie auf einer Hemmung der Enzyymbildung während des Wachstums beruhen. Für die Stärke der Desaminierung ist aber nicht nur allein die C-Quelle, sondern vor allem auch das C:N-Verhältnis der dargebotenen Verbindungen maßgebend. Mitunter finden sich die durchlaufenen Abbauphasen noch in geringer Menge in den Endprodukten vor oder lassen sich durch Abfangverfahren sicherstellen. So baut *Haemophilus parainfluenzae* bei Gegenwart von Pyridinnucleotiden sowohl die l-Asparaginsäure als auch die l-Glutaminsäure zu Essigsäure,  $CO_2$  und  $NH_3$  ab (J. R. KLEIN, 1940); im ersten Falle geht der Abbau über die Oxalessigsäure, Brenztraubensäure und Acetaldehyd, im zweiten Falle sind diesen Zwischenprodukten noch  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure vorgeschaltet.

Die durch Abspaltung von Ameisensäure entstehenden substituierten Essigsäuren können — anscheinend aber nur bei den Aminosäuren mit Ringstruktur — eine Decarboxylierung erfahren; so bilden Anaerobier, wie z. B. *Clostr. putrificum* und *Clostr. Novyi* aus Tyrosin über Phenyl-

essigsäure p-Kresol und aus Tryptophan über Indoleessigsäure Skatol, wobei jedoch auch mit der Möglichkeit einer thermischen  $\text{CO}_2$ -Abspaltung bei der Wasserdampfdestillation gerechnet werden muß.

Ferner lieferten in den Versuchen von STONE u. MACHAMER (1947) sulfatreduzierende Stäbchenbakterien aus Tyrosin entweder p-Kresol oder Phenol, aber niemals beide Verbindungen gleichzeitig. Der zum p-Kresol führende Reaktionsweg scheint über die p-Oxyphenyleessigsäure zu verlaufen, während beim Abbau des Tyrosins zum Phenol die entsprechende Carbonsäure, nämlich die p-Oxybenzoesäure, nicht nachgewiesen werden konnte (STONE u. Mitarb., 1949). Eine alternative Bildung von p-Kresol oder Phenol aus Tyrosin ergab sich auch bei den durch UPDEGRAFF (1949) aus marinen Sedimenten abgeschiedenen fakultativ anaeroben *Pseudomonas*-Arten, wobei die Bildung von p-Kresol bei alleiniger Darbietung von Pepton oder Kasein unter anaeroben Bedingungen erfolgte. Was speziell die Produktion von Phenol betrifft, so war diese in den Versuchen von WILLIAMS u. ENGLISH (1950) an coliformen Stämmen aus verschmutztem Wasser für die zitratnegativen *Escherichia*-Arten charakteristisch.

Unter den wirksamen Mikroben, die eine dehydrierende Desaminierung der  $\alpha$ -Aminosäuren zu gesättigten Fettsäuren herbeiführen, sind vor allem Bakterien zu nennen. So konnte eine solche Umsetzung mittels ruhender Kulturen von *Proteus vulgaris* (BERNHEIM u. WEBSTER, 1935), *Pseudomonas aeruginosa* (WEBSTER u. BERNHEIM, 1926), *Micrococcus*-Arten (EHRISMANN, 1937), *B. coli* und *Salmonella Schottmülleri* (AARON, 1934) — im letzteren Falle mit Methylenblau als Acceptor — beobachtet werden. *Streptococcus*-Arten hingegen zeigten ein nahezu negatives Verhalten (EHRISMANN, 1937; EHRISMANN u. DRAMBURG, 1937). Zuzufolge MIYAJI (1925) bauen *Acetobacter*-Arten, wie *A. aceti* HANSEN, *A. Schützenbachii* und in geringem Ausmaße auch *A. xylinum* und *A. xylinoides* die l(+)-Glutaminsäure zu Bernsteinsäure ab. Letztere Reaktion läuft — so wie oben bezüglich *H. parainfluenzae* angegeben — über die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure und wird auch durch die Hefe bewirkt, die diese Ketosäure auf enzymatischem Wege über die  $\alpha$ -Aldehydopropionsäure in Bernsteinsäure überführt, die sich dann unter den Gärungsprodukten findet.

Die Hauptmenge der Gärungsbernsteinsäure dürfte jedoch nicht aus der Glutaminsäure des Hefe-Eiweißes, also nicht aus dem Gärerreger, sondern vielmehr aus dem Gärsubstrat stammen, da zufolge KLEINZELLER (1941) die Hefe zur Assimilation der  $\text{CO}_2$  nach der WOOD-WERKMANSchen Reaktion befähigt ist, wobei die aus dem Zucker zunächst entstehende Brenztraubensäure unter Anlagerung von  $\text{CO}_2$  in Oxalessigsäure übergeht, die ihrerseits über die Äpfel- und Fumarsäure zur Bernsteinsäure hydriert wird.

Über die Desaminierung durch Schimmelpilze liegen Versuche an *Penicillium glaucum* (WADA, 1930), an *Aspergillus oryzae* (UYEMURA, 1937, 1939) sowie an *Asp. niger* und verschiedenen *Penicillium*-Arten vor.



## 3. Desaminierung zu den Oxysäuren mit gleicher Anzahl von C-Atomen.

Diese Art der Desaminierung findet sich später unter E beschrieben.

## 4. Die wirksamen Enzyme (Aminosäure-desaminasen).

Diese noch relativ wenig untersuchten Mikroben-Enzyme sind offenbar zu den Oxyhydrasen zu rechnen (FRANKE, 1940). Da ihre Reaktion mit dem Luftsauerstoff aber blausäureempfindlich ist, werden sie auch als *Aminosäure-Oxydasen* bezeichnet.

## a) l-Aminosäure-Oxyhydrase (l-Aminosäure-Oxydase).

Die bisher in *Proteus vulgaris* durch BERNHEIM u. WEBSTER (1935) sowie in *Pseudomonas aeruginosa* durch WEBSTER u. BERNHEIM (1926) nachgewiesenen Enzyme sind zellgebunden, und ihre Reaktion mit dem O<sub>2</sub>-Acceptor ist HCN-empfindlich.

Die Desaminase aus *Proteus vulgaris* wurde durch STUMPF u. GREEN (1944) genauer untersucht; unter der Wirkung dieses Enzyms erfahren die  $\alpha$ -Aminosäuren bei Abspaltung von NH<sub>3</sub> eine direkte Oxydation zur entsprechenden Ketosäure, wobei für je 1 Mol gebildeten Ammoniaks  $\frac{1}{2}$  Mol Sauerstoff verbraucht wird gemäß der Gleichung



In gleicher Weise wirkt auch die aus einer Reihe von Schimmelpilzen, wie *Pen. notatum*, *Pen. chrysogenum*, *Pen. expansum* und *Pen. sanguineum* sowie *Asp. niger* in Form von Aceton-Trockenpräparaten gewonnene Pilz-l-Aminosäure-desaminase, die aber zum Unterschied von den aus Bakterien und Rattennieren erhaltenen Präparaten die kurzketigen Aminosäuren rascher desaminiert als die mit längerer, verzweigter oder substituierter Kette (KNIGHT, 1948).

Die Pilz-Desaminase wird zum Unterschied von dem gleichartigen Enzym des *B. coli* (GALE, 1943) bei relativ niedrigem p<sub>H</sub> (4—5) gebildet, obwohl es seine maximale Wirkung erst bei p<sub>H</sub> = 8 entfaltet. Zwecks Prüfung auf Wirksamkeit wurde die Sauerstoff-Aufnahme im WARBURG-Apparat untersucht. Die Menge des gebildeten Enzyms hängt vom N-Gehalt des Zuchtmediums sowie vom Alter des Mycels ab, das 3—7 Tage betragen kann; vom 3. Tag an macht sich meistens schon eine Abnahme der Wirksamkeit bemerkbar (KNIGHT, 1948).

Wegen der Spezifität der tierischen l-Aminosäureoxyhydrase sei auf EDLBACHER u. GRAUER (1944), betreffend ihren komplexen Aufbau (Transaminase-Gehalt) auf die Untersuchungen von BRAUNSTEIN u. Mitarb. verwiesen.

Die *Asparaginsäure*-, *Serin*- und *Threonin*-Desaminase nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als sie durch Biotin aktiviert wird (LICHSTEIN u. UMBREIT, 1947). Auf Grund von Versuchen vermuteten LICHSTEIN u.



CHRISTMAN (1948), daß Adenylsäure mit der Bildung eines Co-Enzyms in Zusammenhang steht, das Biotin oder eine diesem in seiner Wirkung als Wachstumsfaktor gleichkommende Substanz enthält (LICHSTEIN, 1949). Dieses Co-Enzym konnte nunmehr aus Leber und Hefe mittels Papierchromatographie isoliert und als vom Biotin verschieden erkannt werden (CHRISTMAN u. LICHSTEIN, 1950).

#### b) d-Aminosäure-Oxhydrase (d-Aminosäure-Oxydase).

Im Gegensatz zu der nur die natürlichen Aminosäuren dehydrierenden l-Aminosäureoxyhydrase ist die auf die d-Formen eingestellte d-Aminosäureoxyhydrase schon eingehend untersucht, soweit sie aus tierischen Organen stammt. Sie ist zu den sogenannten „gelben Fermenten“ zu rechnen und demnach ein Alloxan-Adeninprotein (WARBURG u. CHRISTIAN, 1938). Infolge weitgehender Dissoziation desselben kann sowohl die prosthetische Gruppe, das Alloxan-adenin-dinucleotid, als auch die Eiweißkomponente für sich dargestellt werden. Das Dinucleotid läßt sich am besten aus Bäckerhefe gewinnen, die an diesem 10—20 mg je kg enthält. Die Eiweißkomponente ist aus Hammelnieren erhältlich (NEGELEIN u. BRÖMEL, 1939).

Der tierischen d-Aminosäureoxyhydrase weitgehend ähnlich, scheint die durch HOROWITZ (1944) aus *Neurospora crassa* gewonnene zu sein, da durch beide Enzyme von allen Aminosäuren Methionin am leichtesten angegriffen wird. Auch EMERSON, KNIGHT u. PUZISS (1949) ist es gelungen, eine die d-Formen angreifende Pilz-Aminosäureoxyhydrase zu erhalten, und zwar aus *Penicillium chrysogenum*. Ferner konnte auch mit *Brucella abortus* eine Desaminierung der d-Form einer Aminosäure, nämlich des d-Alanins, erzielt werden (GERHARDT, LEVINE u. WILSON, 1950).

#### c) l-Glutaminsäure-Dehydrogenase.

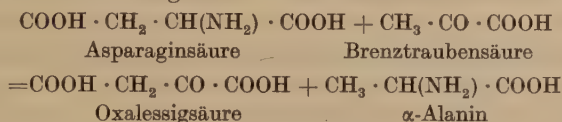
Einen speziellen Fall stellt die Glutaminsäure-Dehydrase dar, die streng spezifisch auf l(+)-Glutaminsäure eingestellt ist und deren reversible Umwandlung über die Iminoglutarinsäure in die Ketoglutarinsäure katalysiert (S. 482). Als Co-Enzym fungiert bei Bakterien und Sproßpilzen die Co-Dehydrase II, während bei den höheren Pflanzen die Co-Dehydrase I auftritt; bei Tieren sind beide Agon-Arten anzutreffen. Außerdem ist noch ein Co-Enzym-Faktor sowie ein Cytochrom-System oder ein Flavin-Enzym beteiligt (DEWAN, 1938).

### 5. Umaminierungen.

Eine Überführung von Aminosäuren in die entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäuren jedoch ohne Mitwirkung des Luftsauerstoffs findet bei der Asparagin- und Glutaminsäure statt, die mit anderen  $\alpha$ -Ketosäuren

derart reagieren, daß ein Austausch zwischen der  $\text{HNH}_2$ -Gruppe und der Ketogruppe, eine sogenannte Umaminierung, eintritt.

Diese zuerst am tierischen Muskel durch BRAUNSTEIN u. KRITZMANN (1937) [vgl. auch BRAUNSTEIN, 1947] festgestellte Reaktion konnte durch ADLER, HELLSTRÖM, GÜNTHER u. v. EULER (1938) am *B. coli* und später mittels verschiedener Bakterien-Suspensionen durch LICHSTEIN u. COHEN (1945<sub>1</sub>) am l-Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Gemisch beobachtet werden, das hierbei in  $\alpha$ -Ketoglutarsäure und l-Asparaginsäure überging. Die Reaktion ist bei  $\text{pH} = 8,5$  und  $32^\circ \text{C}$  optimal und geht auch mit anderen Ketosäuren vor sich, so mit der Brenztraubensäure, wobei an Stelle der Glutaminsäure auch die Asparaginsäure Verwendung finden kann gemäß der Gleichung



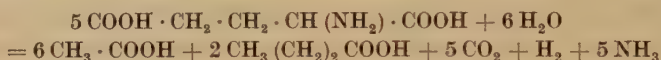
Bei diesen Umaminierungen der Asparagin- und Glutaminsäure mit  $\alpha$ -Ketosäuren ist ein spezifisches Enzym, eine Aminopherase oder Transaminase wirksam. Als deren Co-Enzym ist gemäß den Feststellungen von LICHSTEIN, GUNSALUS u. UMBREIT (1945) Pyridoxalphosphat, das Agon der Aminosäure-Decarboxylase (S. 477) wirksam. So konnten die genannten Forscher ein zellfreies Transaminase-Präparat aus *Streptococcus faecalis R*, dessen Co-Enzym durch Alterung und Dialyse an Wirksamkeit eingebüßt hatte, durch Hinzufügung von Pyridoxalphosphat wieder reaktivieren. Die Wirkung dieses Co-Enzyms spielt sich — wie schon SCHLENK u. SNELL (1945) vermuteten — derart ab, daß es die  $\text{NH}_2$ -Gruppe der Asparagin- bzw. Glutaminsäure unter Bildung von Pyridoxaminphosphat übernimmt, wobei nebenher die betreffende  $\alpha$ -Ketosäure entsteht; das Pyridoxaminphosphat überträgt dann unter Rückbildung des Pyridoxalphosphats die Aminogruppe auf eine andere Ketosäure (GREEN, LOLOIR u. NOCITO, 1945; BELLAMY, UMBREIT u. GUNSALUS, 1945). Diese Umaminierung des Pyridoxals läßt sich zufolge SNELL (1945) auch auf rein chemischem Wege durch Erhitzen mit Glutaminsäure herbeiführen. Mit einem auf diese Weise gewonnenen Präparat konnte die Glutaminsäure-Asparaginsäure-Transaminase in getrockneten Zellen von *Streptococcus faecalis R* stimuliert werden, nicht hingegen jene aus Schweineherz, auf die jedoch Pyridoxalphosphat wirken soll (UMBREIT, O'KANE u. GUNSALUS, 1948).

Da den verschiedenen positiven Befunden über die Co-Enzym-Wirkung des Pyridoxalphosphats auch negative gegenüberstehen, z. B. jene von KARRER u. VISCONTINI (1947), erscheint demnach derzeit der chemische Aufbau des Co-Enzyms der Transaminasen ebensowenig restlos geklärt wie ihre Wirkungsspezifität.

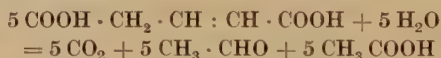
### D. Desaminierung über $\beta$ -Ketosäuren.

Unter der Annahme der Bildung von  $\beta$ -Ketosäuren als Zwischenprodukte läßt sich das Entstehen der um zwei C-Atome ärmeren Fettsäuren und der aus diesen hervorgehenden Kohlenwasserstoffe am einfachsten erklären. So sind Bakterien der *Coli*-, *Proteus*- und *Comma*-Gruppe imstande, aus Tryptophan neben Essigsäure Indolcarbonsäure zu bilden und *Salmonella*-Arten bauen Tyrosin zur p-Oxybenzoesäure und so wie Fäulnisbakterien zu Phenol ab.

Auch die von WOODS u. CLIFTON (1937, 1938) beschriebene anaerobe Desaminierung von 7 Aminosäuren durch gewaschene Suspensionen von *Clostridium tetanomorphum* unter Freiwerden von Wasserstoffgas kann am leichtesten verstanden werden, wenn man  $\beta$ -Ketosäuren — oder ungesättigte Fettsäuren, die eine  $\beta$ -Oxydation erleiden können — als Zwischenprodukte annimmt. Unter Verwendung von Glutaminsäure als Ausgangssubstanz wurden die Reaktionsprodukte quantitativ bestimmt und daraus die folgende Gleichung errechnet:



Durch Oxydoreduktion der aus der Glutaminsäure unter Abspaltung von 5 Mol  $\text{NH}_3$  zunächst entstandenen 5 Mol ungesättigten Fettsäuren unter Verwendung von 5 Mol Wasser mit darauffolgender Decarboxylierung der intermediär gebildeten Aldehydsäure (Formylessigsäure) entstehen gemäß dem Schema



5 Mol Essigsäure, 5 Mol  $\text{CO}_2$  und 5 Mol Acetaldehyd, von welch letzteren 4 Mol durch paarweise Kondensation über Acetaldol 2 Mol Buttersäure liefern. Das 5. Mol Acetaldehyd wird unter Verwendung des 6. Wassermoleküls in das 6. Mol Essigsäure umgesetzt, wobei 1 Mol  $\text{H}_2$ -Gas frei wird:



### E. Desaminierung zu $\alpha$ -Oxysäuren.



Es handelt sich jedoch wahrscheinlich nicht — wie es nach dieser Bruttogleichung scheint — um eine einfache Hydrolyse, sondern entweder um eine über die Ketosäure laufende Oxydoreduktion (vgl. oben unter C3) oder um eine Hydratisierung der zunächst entstehenden ungesättigten Fettsäure (Formelbilder auf S. 480). Letzterer Fall liegt wohl zumeist bei der Bildung von Äpfelsäure aus Asparaginsäure vor, wobei als Zwischenprodukt Fumarsäure auftritt. Es ist jedoch immerhin auch möglich, daß diese Umsetzung durch eine *einheitliche Hydrolase* bewirkt werden kann (VIRTANEN u. ERKAMA, 1938).



Auf diese Weise entstehen aus den  $\alpha$ -Amino-Monocarbonsäuren substituierte Äthyliden-Milchsäuren. So bilden unter anderem *Acetobacter rancens* und *A. xylinoides* aus l-Tyrosin die l-Oxyphenylmilchsäure sowie aus l-Leucin die Isopropylmilchsäure; letztere Umsetzung wird auch durch *A. Schützenbachi* und in geringem Ausmaße auch durch *A. vini acetati* bewirkt. *Acetobacter xylinoides* ist außerdem imstande, l-Histidin in l- $\beta$ -Imidazolylmilchsäure und dl-Phenylalanin in l-Phenylmilchsäure überzuführen (MIYAJI, 1925). Ein solcher ungleicher Angriff auf die beiden optischen Antipoden konnte auch beim Tyrosin festgestellt werden, dessen d-Form durch *Proteus vulgaris* und dessen l-Form durch *Bac. subtilis* umgesetzt werden. Die Bildung von Oxysäuren durch Fäulnisbakterien erfolgt vor allem im alkalischen Milieu, wenn keine andere N-Quelle zur Verfügung steht.

Daß auch substituierte Aminosäuren auf diesem Wege abgebaut werden können, beweist die durch HABILD (1950) beobachtete Desaminierung von 3,5-Dibrom-l-Tyrosin durch *B. coli* zu d-Dibrom-p-oxyphenylmilchsäure.

Außer Bakterien können auch Schimmelpilze Aminosäuren in die entsprechenden Oxysäuren überführen. Auch hier dürfte der über die  $\alpha$ -Ketosäure gehende Reaktionsweg der üblichere sein. So erhielt UYEMURA (1937, 1939) bei Einwirkung von *Asp. oryzae* auf Leucin neben der  $\alpha$ -Oxysäure, der Leucinsäure, auch die zugehörige  $\alpha$ -Ketoisocaproinsäure. Ferner sprechen die Versuche von KOTAKE, CHIKANO u. ICHIHARA (1925) mit *Oospora lactis* (syn. *Geotrichum candidum* SKINNER et al., 1947), die z. B. aus l-Tyrosin unter Umkehrung des Drehungssinnes die d-p-Oxyphenylmilchsäure lieferten, ebenfalls für den Weg über die (optisch inaktive)  $\alpha$ -Ketosäure.

Eine Weiteroxydation der  $\alpha$ -Oxysäuren, vor allem der Leucinsäure und der l-Phenylmilchsäure, mittels Enzympräparaten von *Mycobacterium tuberculosis* und *M. smegmatis* ist durch ROULET, WYDLER u. ZELLER (1946) untersucht worden.

#### F. Desaminierung zu gesättigten Fettsäuren mit gleicher Anzahl von C-Atomen:



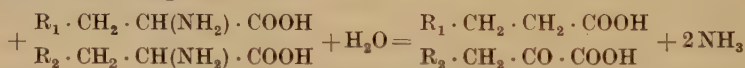
1. *Fäulnisbakterien* bewirken diese Umwandlung offenbar durch direkte Hydrierung der Aminosäuren oder der aus diesen zunächst entstehenden ungesättigten Fettsäuren (S.482). So wird z. B. Tryptophan durch *B. coli*, *Proteus vulgaris* oder *Clostridium Chauvoei* zu Skatolelessigsäure desaminiert. Sofern die wirksamen Mikroben das Enzym Hydrogenase enthalten, kann elementarer Wasserstoff als H-Donator Verwendung finden; auf diesem Wege ist VIRTANEN u. ERKAMA (1938) die reduktive Desaminierung von Glykokoll, Tryptophan und Ornithin gelungen.



Wie CARDON u. BARKER (1946) feststellten, desaminieren zwei aus Meeresschlamm isolierte Anaerobier, *Clostridium propionicum* und *Cl. glycinophilum*, Aminosäuren, und zwar bildet der erstgenannte aus Alanin und Serin aber auch aus Lactaten Propionsäure sowie aus Threonin Buttersäure, während die zweitgenannte Art anscheinend nur Glykokoll anzugreifen vermag. Wie durch BARKER u. WIKÉN (1948) mit markiertem Kohlenstoff ( $C^{14}$ ) ausgeführte Versuche ergaben, führt die Buttersäurebildung aus Threonin *nicht* über das Acetat, vielmehr wahrscheinlich über das  $\alpha$ -Ketobutytrat.

2. *Essigsäurebakterien* sind merkwürdigerweise ebenfalls imstande, die  $NH_2$ -Gruppe durch H zu ersetzen. So entsteht durch *Acetobacter rancens*, *A. xylinoides* und in geringerem Ausmaße auch durch *A. Schützenbachi* aus l-Tyrosin die p-Oxyphenylpropionsäure sowie durch *A. xylinoides* und *A. Schützenbachi* aus Glykokoll Essigsäure (MIYAJI, 1925). Der hierbei eingeschlagene Reaktionsweg ist fraglich.

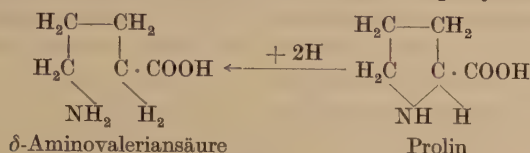
3. *Die STICKLAND-Reaktion* (STICKLAND, 1934, 1935). Gewisse Aminosäuren können unter anaeroben Bedingungen eine reduktive Desaminierung erleiden, also als H-Acceptoren dienen, wobei gleichzeitig andere Aminosäuren als O-Acceptoren bzw. H-Donatoren Verwendung finden. Der Weg führt wahrscheinlich über die ungesättigten Fettsäuren (vgl. die Formelbilder auf S. 480). Die Gesamtreaktion läßt sich durch folgende Gleichung darstellen:



Als H-Acceptoren, die hierbei in die entsprechenden Fettsäuren übergehen, sind Glykokoll, l-Prolin, l-Oxyprolin, l-Arginin und l-Ornithin zu nennen; als H-Donatoren, die Ketosäuren liefern, kommen in Betracht: l-Alanin, l-Phenylalanin, l-Valin, l-Leucin, l-Asparaginsäure und l-Glutaminsäure. Die Ausführung der Reaktion wird am besten in THUNBERG-Röhren vorgenommen, wobei man die Aminosäuren als  $m/_{10}$ -Lösungen verwendet und die Bakterienzellen in Pufferlösungen suspendiert, nachdem man sie im synthetischen Nährmedium von FILDÉS u. RICHARDSON (1935) herangezüchtet hat. Diese Reaktion wird von Bakterien, Sproß- und Schimmelpilzen gegeben, wobei die freiwerdende Energie für das Wachstum genutzt wird; unter den erstgenannten Mikroben sind vor allem die eiweißabbauenden Anaerobier, wie *Clostridium sporogenes* und *Cl. botulinum*, anzuführen, bei denen die STICKLAND-Reaktion den Hauptteil der Lebensenergie bestreiten dürfte (STICKLAND, 1934; WOODS, 1936).

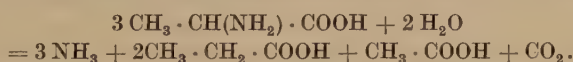
Aus Glykokoll wird neben  $NH_3$  Essigsäure (STICKLAND, 1935<sub>2</sub>) und aus Ornithin  $\delta$ -Aminovaleriansäure (WOODS, 1936) gebildet. Die gleiche Säure entsteht auch aus dem l-Prolin, und zwar durch Ringöffnung, ohne

daß es zu einer  $\text{NH}_2$ -Abtrennung kommt; das hierbei als H-Donator wirkende Alanin wird zu Essigsäure,  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$  oxydiert:

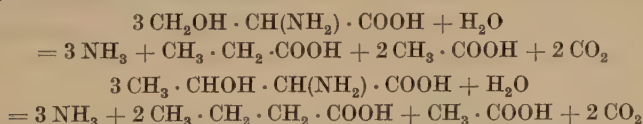


Wegen anderer Bakterien-Arten, die zur Ausführung der STICKLAND-Reaktion befähigt sind, sei auf NISMAN, RAYNAUD u. COHEN (1948) verwiesen.

4. *Oxydoreduktionen an der gleichen Aminosäure.* Es sind auch Oxydo-Reduktionen mit Desaminierung nach Art der STICKLAND-Reaktion bekanntgeworden, bei denen — ähnlich wie bei einer Mutasewirkung — eine und dieselbe Aminosäure sowohl als Donator als auch als Acceptor für den Wasserstoff wirkt, indem 2 Moleküle der Aminosäure zur Fettsäure mit gleicher Anzahl von C-Atomen hydriert werden und 1 Molekül eine Dehydrierung zur entsprechenden Ketosäure erleidet, die dann unter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung in die um ein C-Atom ärmere Fettsäure übergeht (CARDON, 1942; CARDON u. BARKER, 1946, 1947). So bildet das durch CARDON u. BARKER (1946) aus Meeresschlamm isolierte *Clostridium propionicum* aus Alanin unter Desaminierung und partieller Decarboxylierung Propionsäure und Essigsäure gemäß der Gleichung



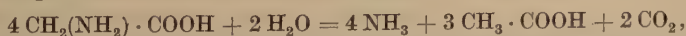
Serin und Threonin erleiden eine ähnliche Umwandlung unter Bildung von Propion- bzw. Buttersäure:



Die Bildung der Buttersäure aus dem Threonin erfolgt nicht über das Acetat, wie BARKER u. WIKÉN (1948) unter Verwendung von markiertem Kohlenstoff ( $\text{C}^{14}$ ) feststellten.

Lactate und Pyruvate werden durch *Cl. propionicum* wie bei der Propionsäure-Gärung in diese Säure übergeführt.

Der spezifisch auf Glykokoll eingestellte gramnegative *Diplococcus glycinophilus* desaminiert diese Aminosäure gemäß nachstehender Gleichung:



wobei jedoch der Mechanismus noch nicht geklärt erscheint. Denn wie BARKER, VOLCANI u. CARDON (1948) unter Verwendung von mit  $\text{C}^{14}$

gekennzeichneten Glykokoll,  $\text{CO}_2$  und Essigsäure feststellten, stammt das gebildete  $\text{CO}_2$  hauptsächlich aus der Carboxylgruppe des Glykokolls, und 75% des  $\text{CH}_3$ -Kohlenstoffs sowie 54% des Carboxyl-Kohlenstoffs leiten sich vom  $\text{CH}_3$ -Kohlenstoff des Glycins her. Wenigstens 6% des Methyl- und 38% des Carboxyl-Kohlenstoffs des gebildeten Acetats stammten aus dem  $\text{CO}_2$ . Zugewetztes Acetat wurde nicht angegriffen.

## G. Öffnung der Ringe heterozyklischer Aminosäuren.

### Indol- Bildung.

1. *Prolin-Ring*. Außer der weiter oben erwähnten reduktiven Öffnung des Prolin-Ringes bei der STICKLAND-Reaktion ist noch eine solche auf oxydativem Wege bekannt, die einer Oxyhydrase, der sogenannten Prolinoxidase, zugeschrieben wird; Präparate dieses Enzyms sind bisher nur aus Niere und Leber erhalten worden.

2. *Imidazol-Ring im Histidin*. Eine Aufspaltung desselben wird durch *B. coli*, *Salmonella paratyphi*, *S. Schottmülleri* sowie *Pseudomonas fluorescens* bewirkt, nicht hingegen durch *Proteus vulgaris*, wohl aber durch „ruhende Kulturen“ (gewaschene Suspensionen) von *Proteus ichtyosmii* (NEILSON u. EAGLES, 1947). In welcher Beziehung das hierbei wirksame Enzym zur tierischen *Histaminase* steht, ist noch nicht geklärt.

Diese letztere stellt eine Diamino-Oxyhydrase (Diamino-Oxydase) dar, die vor allem in Niere und Darm aber auch in verschiedenen Bakterien-Arten (*B. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *B. (Klebs.) pneumoniae*, *Bac. putrificus*, Vibrionen, Rauschbranderreger) und Schimmelpilzen (wie *Asp. oryzae*, *Asp. niger*, *Claviceps purpurea*) nicht hingegen in Hefen aufgefunden wurde. Während die Histaminase aus Tieren und Bakterien außer Histamin auch Diamine vom Typus des Cadaverins abbaut, beschränkt sich die Pilz-Histaminase auf die Bindung des genannten Diamins, ohne es aber anzugreifen (WERLE, 1941; EHRLSMANN u. WERLE, 1948).

Das in der Leber vorkommende Enzym *Histidase* verursacht ebenfalls eine Öffnung des Imidazol-Ringes, doch scheint dieselbe zu anderen Reaktionsprodukten zu führen.

3. *Pyrrol-Ring im Tryptophan bzw. Indol*. Da in neuerer Zeit die Ansicht vertreten wird, daß der Indolbildung eine primäre Öffnung des Pyrrol-Ringes im Tryptophan vorausgeht, soll der Tryptophan-Abbau an dieser Stelle besprochen werden.

#### a) Typen des Tryptophan-Abbaues.

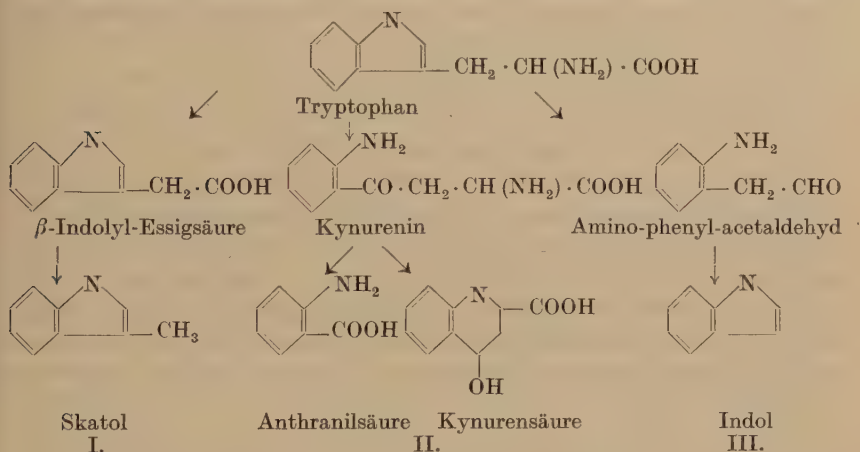
Nach den hierbei auftretenden vornehmlichsten Produkten kann man die Bakterien in 3 Gruppen sondern:

α. Obligate Anaerobier (*Clostridium*-Arten): Bildung von β-Indolyllessigsäure neben Skatolessigsäure und eventuell auch Skatol. Das Auftreten des letzteren ist sicher bei *Clostridium skatol* erwiesen (FELLERS u. CLOUGH, 1925); in den meisten anderen Fällen, in denen Skatol nachgewiesen wurde, dürfte dies erst sekundär bei der Wasserdampfdestillation der sauren Lösung aus primär gebildeter β-Indolyl-Essigsäure entstanden sein (FRIEBER, 1921).

$\beta$ . Obligate Aerobier (*Pseudomonas*- und aerobe *Bacillus*-Arten): Öffnung des Pyrrol-Ringes im Tryptophan unter Bildung von Anthranilsäure; die gleiche Säure bildet *Ps. aeruginosa* auch aus Indol. Neben der Anthranilsäure konnte KOTAKE (1933) durch *Bac. subtilis* aus Tryptophan in Gegenwart von Glycerin die Kynurensäure erhalten, deren Formel BUTENANDT u. Mitarb. (1943) richtigstellten (vgl. weiter unten).

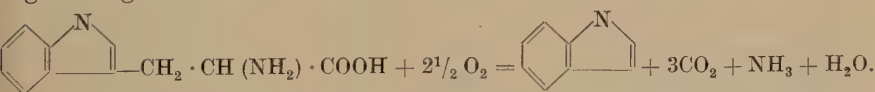
Im tierischen Organismus, in dem die Kynurensäure aus Kynurenin entsteht, soll dieser Übergang durch oxydative Desaminierung über o-Amino-benzoyl-brenztraubensäure erfolgen (vgl. WISS u. HATZ, 1949); über das wirksame Enzym, die *Kynureninase*, verdanken wir WISS (1949) nähere Angaben.

$\gamma$ . Fakultativ anaerobe Bakterien (*Coli*-, *Cloacae*-, *Proteus*-, *Comma*-Gruppe): Bildung von Indol:



b) Endprodukte der Indolbildung aus Tryptophan durch *B. coli*.

$\alpha$ ) Auf Grund von Versuchen mit ruhenden Kulturen (gewaschenen Suspensionen) von *B. coli* hat WOODS (1935) die folgende Umsatzgleichung ermittelt:



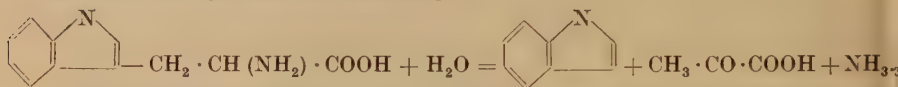
Bei derartigen Umsatzversuchen kann der Sauerstoff-Verbrauch manometrisch, die Tryptophanabnahme nach VAN SLYKE oder colorimetrisch und das gebildete Indol colorimetrisch mit EHRLICH'S Reagens (= p-Dimethylaminobenzaldehyd) (MAJIMA, 1936; FILDES, 1938) oder mit  $\beta$ -Naphthochinonmonosulfonat (HAPPOLD u. HOYLE, 1934) bestimmt werden. Unter anaeroben Bedingungen hingegen wandelt *B. coli* Tryptophan in  $\beta$ -Indolpropionsäure um. Eine Bestätigung der WOODSSCHEN Ergebnisse hat MAJIMA (1936) erbracht.

Wie EVANS, HANDLEY u. HAPPOLD (1942) feststellten, üben Glucose und einige andere Kohlenhydrate auf die Indol-Bildung in Kulturen des



*Bact. coli* eine hemmende Wirkung aus, die sich bis zur Stufe Triosephosphat-Phosphoglycerinester bemerkbar macht.

β) Beim Arbeiten mit zellfreien, aus Trockenpräparaten von *B. coli* durch Extraktion gewonnenen Lösungen haben jedoch WOOD, GUNSALUS u. UMBREIT (1947) aus Tryptophan neben Indol und  $\text{NH}_3$  Brenztraubensäure erhalten gemäß der Gleichung



Die Brenztraubensäure ist in den oben erwähnten Versuchen von WOODS (1935) und MAJIMA (1936) mit Bakterien-Suspensionen anscheinend bis zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  weiteroxydiert worden.

b) Zwischenprodukte und Reaktionsweg der Indolbildung aus Tryptophan.

Alle vermeintlichen Zwischenprodukte des Tryptophan-Abbaues, wie die Indolyl-(Ind.)-Abkömmlinge der Brenztraubensäure,  $\text{Ind.} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$ , der Acrylsäure,  $\text{Ind.} \cdot \text{CH} : \text{CH} \cdot \text{COOH}$ , der Äthylidenmilchsäure,  $\text{Ind.} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{COOH}$ , der Propionsäure,  $\text{Ind.} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ , der Essigsäure,  $\text{Ind.} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ , oder die Indolcarbonsäure,  $\text{Ind.} \cdot \text{COOH}$ , noch auch das Indolyl-äthylamin,  $\text{Ind.} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2\text{NH}_2$ , konnten bisher weder mit wachsenden Kulturen noch mit Suspensionen oder Trockenpräparaten indolbildender Mikroben nachgewiesen oder unmittelbar in erheblichem Ausmaße in Indol übergeführt werden (FRIEBER, 1921; SAITO, 1933; HAPFOLD u. HOYLE, 1935; WOODS, 1935). Für die Indolbildung ist eben Voraussetzung, daß im Tryptophan die Seitenkette und die  $\text{NH}$ -Gruppe unverändert erhalten sind (DAWES, 1948).

Um so bemerkenswerter war daher die Feststellung von KREBS, HAFEZ u. EGGLESTON (1942), daß o-Amino-β-phenyläthanol durch *B. coli* unter aeroben Verhältnissen in Indol umgewandelt wird, weshalb die genannten Forscher annehmen, daß der biologische Abbau des Tryptophans beim Indolring beginnt, indem zunächst ein Oxindol-Derivat entsteht, das nach Öffnung des Ringes durch Abbau der Seitenkette in Amino-phenyl-acetaldehyd übergeht, aus dem dann Indol gebildet wird.

c) Das Enzymsystem (Tryptophanoxydase, Tryptophanase).

Für die Überführung des Tryptophans in Indol wird eine eigene Tryptophanoxydase oder Tryptophanase angenommen (HAPFOLD u. HOYLE, 1935). Ein Rohpräparat derselben konnte durch Behandlung gewaschener Suspensionen von *B. coli* mit Chloroform und durch Ausfällung mit Äthanol sowie Trocknung mit Alkohol-Äther erhalten werden. Eine zellfreie Enzymlösung gewannen DAWES u. Mitarb. (1946) durch Extraktion eines Aceton-Präparates mittels eines Borat-Puffers ( $\text{pH} = 8$  bis 8,5).

Das Rohenzym Tryptophanase erzeugt zufolge DAWES (1948) aus Tryptophan unter Verbrauch von 5 Sauerstoff-Atomen Indol; es gehen demnach oxydative Prozesse im gleichen Ausmaße vor sich, wie sie durch WOODS (1935) und MAJIMA (1936) mit gewaschenen Suspensionen von *B. coli* festgestellt worden waren (vgl. die Gleichung auf S. 495).

Bei der Reinigung des Enzyms durch Dialyse tritt eine Abspaltung des Agons (Co-Enzyms) ein. Das gereinigte Pheron (Apo-Enzym) kann durch Pyridoxalphosphat wieder reaktiviert werden und wirkt dann anaerob auf Tryptophan unter Bildung von je einem Molekül Indol, Brenztraubensäure und  $\text{NH}_3$ . Die gleichen Produkte haben — wie oben bereits mitgeteilt wurde — WOODS, GUNSALUS u. UMBREIT (1947) mit zellfreien *Coli*-Lösungen erhalten. Den gleichen Forschern zufolge weist die Tryptophanase wohl eine große Ähnlichkeit mit dem in *Neurospora* enthaltenen, Tryptophan aus Indol und Serin synthetisierenden Enzym auf, ist jedoch mit demselben nicht identisch.

#### H. Abbau des Arginins zu Ornithin.

Der Abbau des Arginins zu Ornithin durch Fäulnisbakterien wurde auf die Wirkung des Enzyms Arginase zurückgeführt, das die hydrolytische Spaltung des Arginins in Ornithin und Harnstoff katalysiert. Daß jedoch auch noch ein anderer Abbauweg zur Verfügung steht, hat HILLS (1940) unter Verwendung von Staphylokokken und Streptokokken gezeigt, die an Stelle von Harnstoff  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$  lieferten, obwohl keine Urease-Wirkung vorlag.

#### Literatur.

- AARON, K.: Biochem. Z. **268**, 121 (1934). — ADLER, E., V. HELLSTRÖM, G. GÜNTHER u. H. v. EULER: Z. physiol. Chem. **255**, 14 (1938). — AKASI, S.: Acta Scholae med. Kioto **22**, 433 (1939). — ANDERSON, K. E.: Sci. Stud. (St. Bonaventure Coll.) **13**, 2 (1947). — ARAI, M.: Biochem. Z. **122**, 251 (1921). — AUBEL, S., et F. EGAMI: C. r. Soc. biol. Paris **120**, 684 (1935). — BADDILEY, J., and E. F. GALE: Nature **155**, 727 (1945). — BARKER, H. A., B. E. VOLCANI and B. P. CARDON: J. of biol. Chem. **173**, 803 (1948). — BARKER, H. A., and T. WILKÉN: Arch. Biochem. **27**, 149 (1948). — BELLAMY, W. D., and I. C. GUNSALUS: J. Bacter. **48**, 191 (1944<sub>1</sub>). — J. of biol. Chem. **155**, 557 (1944<sub>2</sub>). — BELLAMY, W. D., W. W. UMBREIT and I. C. GUNSALUS: J. of biol. Chem. **160**, 461 (1945). — BERNHEIM, F., M. L. C. BERNHEIM and M. D. WEBSTER: J. of biol. Chem. **110**, 165 (1935). — BERTHELOT, A., et D. M. BERTRAND: C. r. Acad. Sci. Paris **154**, 1826 (1912); **166**, 187 (1918). — BILLEN, D., and H. C. LICHSTEIN: J. BACTER. **58**, 215, (1949). — BLASCHKO, H., and G. H. S. STANLEY: Biochem. J. **42**, 111 (1948). — BRAUNSTEIN, A. E.: Advances in Protein Chem. **3**, 1 (1947). — BRAUNSTEIN, A. E., and R. M. AZARKH: Biokhim. (Russ.) **9**, 337 (1944). — J. of biol. Chem. **157**, 421 (1944). — BRAUNSTEIN, A. E., and S. M. BYCHKOV: Biokhim. (Russ.) **5**, 261 (1939). — Nature **144**, 351 (1939). — BRAUNSTEIN, W. E., and M. C. KRITZMANN: Enzymologia **2**, 129 (1937). — Nature **158**, 102 (1946). — BUTENANDT, A., W. WEIDEL, R. WEICHERT u. W. DERJUGEN: Z. physiol. Chem. **279**, 27 (1943). — CARDON, B. P.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **51**, 267 (1942). — CARDON, B. P., and H. A. BARKER: J. Bacter. **52**, 629 (1946). — Arch. Biochem. **12**, 165 (1947). — CHAIX, P., et K. TCHEN-PAU:

- Trav. Membres Bull. Soc. Chim. Biol. **25**, 1374 (1943). — CHRISTMAN, J. F., and H. C. LICHSTEIN: *J. Bacter.* **60**, 107 (1950). — COHEN, G. N., M. RAYNAUD, G. COHEN-BAZIRE et B. NISMAN: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **29**, 644 (1947). — COHEN, G. N., et R. SAISSAC: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **29**, 647 (1947). — COOK, R. P., and B. WOOLF: *Biochem. J.* **22**, 474 (1928). — DAWES, E. A.: *Nature (London)* **162**, 229 (1948). — DAWES, E. A., J. DAWSON and F. C. HAPFOLD: *Biochem. J.* **40** XLV (1946). — DESNUELLE, P.: *Enzymologia* **6**, 242 (1939); **6**, 387 (1940). — DESNUELLE, P., et C. FROMAGEOT: *Enzymologia* **6**, 80 (1939). — DESNUELLE, P., et L. GRAND: *Trav. Membres Bull. Soc. Chim. Biol.* **25**, 1133, 1227 (1943). — DESNUELLE, P., L. GRAND et C. FROMAGEOT: *Trav. Membres Bull. Soc. Chim. Biol.* **26**, 1001 (1944). — DEWAN, J. G.: *Biochem. J.* **32**, 1378 (1938). — EDLBACHER, S., u. H. GRAUER: *Helvet. chim. Acta* **27**, 151, 928 (1944). — EGAMI, F.: *Bull. Soc. Chim. Biol. Paris* **20**, 301 (1938). — EGGERTH, A. H.: *J. Bacter.* **37**, 205 (1939). — EHRLSMANN, O.: *Z. Hyg.* **119**, 572 (1937). — EHRLSMANN, O., u. K. DRAMBURG: *Z. Hyg.* **119**, 623 (1937). — EHRLSMANN, O., u. E. WERLE: *Biochem. Z.* **318**, 560 (1948). — EHRLICH, F.: *Z. physiol. Chem.* **181**, 140 (1929). — EMERSON, R. L., S. G. KNIGHT and M. PUZISS: *Soc. Amer. Bact. Abstracts*, 49th Meeting **40** (1949). — EPPS, H. M. R.: *Biochem. J.* **38**, 242 (1944); **39**, 42 (1945). — EVANS, W. C., W. C. R. HANDLEY and F. C. HAPFOLD: *Biochem. J.* **36**, 311 (1942). — FELLERS, C. R., and R. N. CLOUGH: *J. Bacter.* **10**, 105 (1925). — FILDERS, P.: *Biochem. J.* **32**, 1600 (1938). — FILDERS, P., and G. M. RICHARDSON: *Brit. Jour. exper. Path.* **16**, 326 (1935). — FRANKE, W.: *Angew. Chem.* **52**, 695, 703 (1939). — FRIEBER, W.: *Zbl. Bakter. I. Abt., Orig.* **87**, 254 (1921). — FROMAGEOT, C., L. GRAND et P. DESNUELLE: *Trav. Membres Bull. Soc. Chim. Biol.* **26**, 1115 (1944). — FROMAGEOT, C., et K. TCHEN-PAU: *Trav. Membres Bull. Soc. Chim. Biol.* **23**, 1471 (1941); **25**, 1006 (1943). — GALE, E. F.: *Biochem. J.* **32**, 1583 (1938); **34**, 392 (1940<sub>1</sub>); **34**, 846 (1940<sub>2</sub>); **34**, 853 (1940<sub>3</sub>). — *Bact. Rev.* **4**, 135 (1940<sub>1</sub>). — *Biochem. J.* **35**, 66 (1941). — *Bact. Rev.* **7**, 139 (1943). — *Biochem. J.* **39**, 46 (1945). — *Advances in Enzymology* **6**, 1 (1946). — GALE, E. F., and H. M. R. EPPS: *Biochem. J.* **38**, 232 (1944). — GEIGER, E.: *Arch. Biochem.* **17**, 391 (1948). — GERHARDT, PH., H. B. LEVINE and J. B. WILSON: *J. Bacter.* **60**, 459 (1950). — GREEN, D., L. LOLOIR and V. NOCITO: *J. of biol. Chem.* **161**, 559 (1945). — GUNSA-LUS, J. C., W. D. BELLAMY and W. W. UMBREIT: *J. of biol. Chem.* **155**, 685 (1944). — HABILD, G.: *Z. physiol. Chem.* **285**, 127 (1950). — HANKE, M. T., and K. K. KOESSLER: *J. of biol. Chem.* **59**, 111 (1922); **59**, 835, 855, 876 (mit J. A. WALKER) (1924). — HAPFOLD, F. C., and L. HOYLE: *Biochem. J.* **28**, 1171 (1934); **29**, 1918 (1935). — HARRIS, S. A., E. HEYL and K. FOLKERS: *J. Amer. chem. Soc.* **66**, 2088 (1944). — HEIGENER, H.: *Zbl. Bakter. II. Abt.* **93**, 81 (1935). — HERBST, E. J., and E. E. SNELL: *J. of biol. Chem.* **181**, 47 (1949). — HILLS, G. M.: *Biochem. J.* **34**, 1057 (1940). — HIRAI, K.: *Biochem. Z.* **267**, 1 (1933); **283**, 390 (1935). — HIRD, F. J. R., and E. V. ROWSELL: *Nature* **166**, 517 (1950). — HOROWITZ, N. H.: *J. of biol. Chem.* **154**, 141 (1944). — JANKE, A.: *Arch. Mikrob.* **1**, 304 (1930). — JANKE, A., u. W. TAYENTHAL: *Biochem. Z.* **289**, 76 (1936). — KARRER, P., u. M. VISCONTINI: *Helv. chim. Acta* **30**, 52, 524, 528 (1947). — KARRER, P., M. VISCONTINI u. O. FORSTER: *Helv. chim. Acta* **31**, 1004 (1948). — KLEIN, G., u. D. BOSER: *Arch. Pharmaz.* **270**, 374 (1932). — KLEIN, J. R.: *J. of biol. Chem.* **134**, 43 (1940). — KLEINZELLER, A.: *Biochem. J.* **35**, 495 (1941). — KNIGHT, S. G.: *J. Bacter.* **55**, 401 (1948). — KOCHER, V., u. K. VOGLER: *Helv. chim. Acta* **31**, 352 (1948). — KOESSLER, K. K., a. M. T. HANKE: *J. of biol. Chem.* **39**, 539 (1919). — KOTAKE, Y.: *Z. physiol. Chem.* **214**, 1 (1933). — KOTAKE, Y., M. CHIKANO u. K. ICHIHARA: *Z. physiol. Chem.* **143**, 218 (1925). — KREBS, H. A., M. M. HAFEZ and L. V. EGGLESTON: *Biochem. J.* **36**, 306 (1942). — LICHSTEIN, H. C.: *J. of biol. Chem.* **177**, 125 (1949). — LICHSTEIN, H. C., and J. F. CHRISTMAN: *J. of biol. Chem.* **175**, 649 (1948). — LICHSTEIN, H. C., and



- P. P. COHEN: J. of biol. Chem. **157**, 85 (1945<sub>1</sub>); **159**, 367 (1945<sub>2</sub>). — LICHSTEIN, H. C., I. C. GUNSALUS and W. W. UMBREIT: J. of biol. Chem. **161**, 311 (1945). — LICHSTEIN, H. C., and W. W. UMBREIT: J. of biol. Chem. **170**, 423 (1947). — MCGILVER, R. W., and P. P. COHEN: J. of biol. Chem. **174**, 813 (1948). — MAJIMA, S.: Z. physiol. Chem. **243**, 247 (1936). — MARDASHEV, S. R.: Microbiol. (Russ.) **16**, 469 (1947). — MARDASHEV, S. R., u. R. N. ETINGOF: Biokhim. (Russ.) **13**, 402 (1948). — MARDASHEV, S. R., u. V. N. GLADKOVA: Biokhim. (Russ.) **13**, 315 (1948). — MEAD, M. W. jun., and C. G. KING: J. Bacter. **17**, 151 (1929). — MIYAJI, K.: J. chem. Soc. Japan **45**, 391 (1925). — MORTON, R. K.: Nature **166**, 1092 (1950). — NEGELEIN, E., u. H. BRÖMEL: Biochem. Z. **300**, 225 (1939). — NEILSON, N. E., and B. A. EAGLES: Trans. Roy. Soc. Canada, Sect. 5, **41**, 91 (1947). — NEUBERG, C., u. L. KARCZAG: Biochem. Z. **18**, 435 (1909). — NISMAN, B., M. RAYNAUD and G. N. COHEN: Arch. Biochem. **16**, 473 (1948). — NORD, F. F.: Biochem. Z. **95**, 281 (1919). — RAISTRICK, H.: Biochem. J. **11**, 71 (1917). — ROPER, J. A., and H. McILWAIN: J. gen. Microbiol. **2**, 28 (1948). — ROULET, F., H. WYDLER u. E. A. ZELLER: Helv. chim. Acta **29**, 1973 (1946). — SAITO, J.: Z. physiol. Chem. **214**, 28 (1933). — SCHLENK, F., and E. E. SNELL: J. of biol. Chem. **157**, 425 (1945). — SKINNER, C. E., C. W. EMMONS and H. M. TSUCHIYA: in HENRICI, Molds, Yeasts, Actinomycetes (New York 1947). — SNELL, E.: J. of biol. Chem. **157**, 491 (1945). — STEPHENSON, M.: Bacterial Metabolism. 3. Aufl. (London-New York-Toronto 1949). — STEPHENSON, M., and E. F. GALE: Biochem. J. **31**, 1316 (1937). — STICKLAND, L. H.: Biochem. J. **28**, 1746 (1934); **29**, 288 (1935<sub>1</sub>); **29**, 889 (1935<sub>2</sub>). — STONE, R. W., and H. E. MACHAMER: J. Bacter. **54**, 39 (1947). — STONE, R. W., H. E. MACHAMER, W. J. McALEER and T. S. OAKWOOD: Arch. Biochem. **21**, 217 (1949). — STUMPF, P. K., and D. E. GREEN: J. of biol. Chem. **153**, 387 (1944). — TARR, H. L. A.: Biochem. J. **27**, 759 (1933). — TAYLOR, E. S., and E. F. GALE: Biochem. J. **39**, 52 (1945). — THORNE, R. S. W.: J. Inst. Brew. **43**, 288 (1937). — UMBREIT, W. W.: Ann. Rev. Microbiol. **3**, 87 (1949). — UMBREIT, W. W., and J. C. GUNSALUS: J. of biol. Chem. **159**, 333 (1945). — UMBREIT, W. W., D. J. O'KANE and J. C. GUNSALUS: J. of biol. chem. **176**, 629 (1948). — UMBREIT, W. W., W. H. WOOD and J. C. GUNSALUS: J. of biol. Chem. **165**, 731 (1946). — UPDEGRAFF, D. M.: J. Bacter. **57**, 555 (1949). — UYEMURA, T.: Bull. agric. chem. Soc. (Jap.) **13**, 107, 108 (1937); **15**, 74 (1939). — VIRTANEN, A. I., and J. ERKAMA: Nature **142**, 954 (1938). — VIRTANEN, A. I., and T. LAINE: Suom. Kemist. **9B**, 17 (1936). — Enzymologia **3**, 266 (1937). — VIRTANEN, A. I., T. LAINE and P. RINTALA: Enzymologia **9**, 53 (1940). — VIRTANEN, A. I., P. RINTALA and T. LAINE: Nature **142**, 674 (1938). — VIRTANEN, A. I., u. J. TARNANEN: Suom. Kemist. **4**, Nr. 10, Suppl. 21 (1931). — Z. physiol. Chem. **204**, 247 (1932). — VÖGLER, K.: Helv. chim. Acta **30**, 1766 (1947). — WADA, S.: Acta Scholae med. Kyoto **13**, 128 (1930). — WARBURG, O., u. W. CHRISTIAN: Biochem. Z. **298**, 368 (1938). — WEBSTER, M. D., and F. BERNHEIM: J. of biol. Chem. **114**, 265 (1926). — WERLE, E.: Biochem. Z. **309**, 61 (1941). — Die Chemie **56**, 141 (1943). — Z. Vit. Hormon- u. Fermentforsch. **1**, 504 (1948). — WILLIAMS, O. B., and J. D. ENGLISH: J. Bacter. **60**, 101 (1950). — WISS, O.: Helv. chim. Acta **32**, 1694 (1949). — WISS, O., u. H. FUCHS: Helv. chim. Acta **32**, 2553 (1949). — WISS, O., u. F. HATZ: Helv. chim. Acta **32**, 532 (1949). — WOLF, F. T.: Arch. Biochem. **16**, 143 (1948). — WOOD, W. A., J. C. GUNSALUS and W. W. UMBREIT: J. of biol. Chem. **170**, 313 (1947). — J. Bacter. **54**, 4 (1947). — WOODS, D. D.: Biochem. J. **29**, 640 (1935<sub>1</sub>); **29**, 649 (1935<sub>2</sub>); **30**, 1934 (1936). — WOODS, D. D., and C. E. CLIFTON: Biochem. J. **31**, 1774 (1937); **32**, 345 (1938). — WOOLF, B.: Biochem. J. **23**, 472 (1929). — YAMADA, M.: Bull. agric. chem. Soc. (Jap.) **11**, 19, 21, 22, 24, 26, 27 (1935). — YAMADA, M., and S. ISHIDA: J. agric. chem. Soc. (Jap.) **2**, 1 (1926).



## Autoren-Verzeichnis.

- AM ENDE, INGEBORG. Zur Ernährungsphysiologie des Pilzes der *Xanthoria parietina*. S. 185.
- BAUMANN, A., und V. DENK. Zur Physiologie der Sulfatreduktion. S. 283.
- BEATUS, RICHARD. Entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen an *Ascomyceten*. S. 253.
- BEHRENBRUCH, H., siehe DIETZEL, E.
- BERNHAEUER, KONRAD, siehe GROSSER, ANNEMARIE.
- BÖMEKE, H. Nitrosomonas oligocarbo-genes, ein obligat autotrophes Nitrit-bacterium. S. 414.
- BRINGMANN, GOTTFRIED. Methoden der Selektion zur Steigerung der anti-biotischen Wirksamkeit bei *Peni-cillium notatum*. S. 85.
- BURCIK, ERWIN. Über die Beziehungen zwischen Hydratur und Wachstum bei Bakterien und Hefen. S. 203.
- CZAJA, ALFONS THEODOR. Stalaktiten-Fruchtkörper von *Merulius lacry-mans* var. *domesticus*. S. 176.
- DENK, VIKTOR. Zur Frage der Ammon-entstehung im Stoffkreislauf der Natur. (Vorläufige Mitteilung.) S. 308.
- siehe BAUMANN, A.
- DIEHL, A., siehe GESSNER, F.
- DIETZEL, E., H. BEHRENBRUCH und M. EUCKEN. Stoffwechselversuche an *Actinomycceten*. S. 179.
- EUCKEN, M., siehe DIETZEL, E.
- FINCK, GERTRUD. Biologische und stoff-wechselphysiologische Studien an *Myxococcaceen*. S. 358.
- FÜCHTBAUER, HERTA. Vorkommen von *Azotobacter agilis Beijerinck* in Deutschland. S. 252.
- GESSNER, FRITZ, und AMELY DIEHL. Die Wirkung natürlicher Ultra-violettstrahlung auf die Chlorophyll-zerstörung von Planktonalgen. S. 439.
- GROSSER, ANNEMARIE, HANNE KUNDT-  
NER-SCHWARZKOPF und KONRAD  
BERNHAEUER. Über den Einfluß der  
Kultivierungsbedingungen auf die  
Farbstoffbildung durch *Penicillium*-  
Arten. S. 236.
- Einige Beobachtungen über die  
*Conidienbildung* in der Submers-  
kultur verschiedener *Penicillium*-  
Arten. S. 247.
- HEINZEL, EDITH. Experimentelle Unter-  
suchungen zur Ausbildung von  
Faden- und Kettenformen bei *Bac-  
terium prodigiosum*. S. 119.
- HOLZ, G., siehe WILHARM, G.
- JANKE, ALEXANDER. *Acetobacter Lafari-  
anum* nov. nom. S. 116.
- Der mikrobielle Abbau der Amino-  
säuren. Sammelbericht. S. 472.
- JOHANNES, HEINRICH. Beiträge zur  
Vitalfärbung von Pilzmyccelien. S. 13.
- KANDLER, OTTO. Über den Einfluß von  
Bodenbakterien und deren Filtraten  
auf das Wachstum in vitro kulti-  
vierter Wurzeln. S. 430.
- KAPLAN, REINHARD W. Mutationsaus-  
lösung bei *Bacterium prodigiosum*  
durch sichtbares Licht nach Vital-  
färbung mit Erythrosin. S. 152.
- KREHL-NIEFFER, ROSE M. Verbreitung  
und Physiologie mikroskopischer  
Bodenpilze. Eine mykologische  
Studie als Beitrag zur Mikroflora  
der Umgebung Stuttgarts. S. 389.
- KÜSTER, EBERHARD. Untersuchungen  
über die Bildung und Zersetzung von  
Humusstoffen durch Mikroorganis-  
men. S. 1.
- KUNDTNER-SCHWARZKOPF, HANNE,  
siehe GROSSER, ANNEMARIE.
- MÜLLER, HANNELORE. Oxalsäure als  
Kohlenstoffquelle für Mikroorganis-  
men. S. 137.

- MÜLLER-STOLL, WOLFGANG R. Untersuchungen über das Verhalten von *Botrytis cinerea* gegenüber Seifen und Seifenersatzstoffen. S. 454.
- REINHARDT, KARL. Der Stoffwechsel heterotropher Flagellaten III bis VIII. III. Mitteilung. S. 270.
- RÜMKER, ROSMARIE VON, siehe WINTER, A. GERHARD.
- SCHULZE, KARL LUDWIG. Beiträge zur Physiologie und Technologie der Fettbildung bei Mikroorganismen. S. 315.
- STILLE, BERND. Eine mikrobiologische Methode zum Nachweis von Samen- und Wurzelausscheidungen. S. 149.
- WILHARM, G., und G. HOLZ. Beitrag zur Kenntnis des Acroleins in Obstbränden, Maischen und Mosten. 2. Mitteilung. Isolierung acroleinbildender Mikroorganismen und Erzeugung von Acrolein durch die gewonnenen Reinkulturen. S. 403.
- WINTER, A. GERHARD, und ROSMARIE VON RÜMKER. Die Mikroflora der Rhizosphäre als resistenzbestimmender Faktor. S. 72.
- Untersuchungen über die Ökologie und den Massenwechsel bodenbewohnender mikroskopischer Pilze. S. 42.
- ZIEGLER, HUBERT. Über eine neue Beeinflussung der Sporangienentwicklung von *Phycomyces* durch Paraffinöl. S. 428.
-

